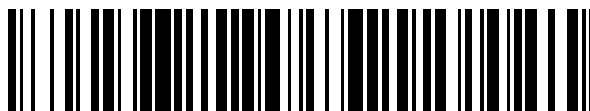


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 366**

51 Int. Cl.:

C12N 9/26

(2006.01)

C12N 15/56

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04756144 .4**

96 Fecha de presentación: **25.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1648996**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Enzimas para el tratamiento de almidón**

30 Prioridad:
25.06.2003 DK 200300949
25.06.2003 US 482589 P
29.07.2003 US 490751 P
14.10.2003 US 511044 P
24.10.2003 DK 200301568
27.10.2003 US 514854 P
10.05.2004 US 569862 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
**NOVOZYMES A/S
KROGSHØJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK y
NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC.**

72 Inventor/es:
**TAIRA, Rikako;
TKAGI, Shinobu;
HJORT, Carsten;
VIKSO-NIELSEN, Anders;
ALLAIN, Eric;
UDAGAWA, Hiroaki;
FUKUYAMA, Shiro y
MATSUI, Tomoko**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

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).

ES 2 383 366 T3

DESCRIPCIÓN

Enzimas para el tratamiento de almidón

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere, entre otras cosas, a una enzima comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos ("CBM") y un dominio catalítico de alfa-amilasa. La enzima puede ser un híbrido entre un módulo de unión a carbohidratos ("CBM") y una alfa-amilasa o la enzima puede ser una variante de una enzima progenitora comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos ("CBM") y un dominio catalítico de alfa-amilasa. La invención también se refiere al uso de la enzima en un proceso de licuefacción de almidón en el que almidón se degrada en fragmentos más pequeños de oligo- y/o polisacáridos.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Un gran número de enzimas y procesos se han descrito para convertir almidón en hidrolizados de almidón, tal como maltosa, glucosa o jarabes de especialidad, bien para uso como edulcorantes o como precursores para otros sacáridos tal como fructosa. Glucosa puede también ser fermentada a etanol u otros productos de fermentación, tales como ácido cítrico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato de calcio, gluconato de potasio, glucono delta lactona, o eritorbato de sodio, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico; cetonas; aminoácidos, ácido glutámico (monoglutaminato de sodio), penicilina, tetraciclina, enzimas, vitaminas, tal como riboflavina, B12, beta-caroteno u hormonas.

[0003] El almidón es un polímero de peso molecular alto que consiste en cadenas de unidades de glucosa. Normalmente consiste en aproximadamente 80% de amilopectina y 20% de amilosa. La amilopectina es un polisacárido ramificado en el que cadenas lineales de residuos de alfa-1,4 D-glucosa se unen por enlaces alfa-1,6 glucosídicos.

[0004] La amilosa es un polisacárido lineal hecho de unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces alfa-1,4 glucosídicos. En el caso de la conversión del almidón en un hidrolizado de almidón soluble, el almidón es despolimerizado. El proceso de despolimerización convencional consiste en un paso de gelatinización y dos pasos de proceso consecutivos, a saber, un proceso de licuefacción y un proceso de sacarificación.

[0005] Almidón granular consiste en gránulos microscópicos, que son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando un compuesto de almidón acuoso se calienta, los gránulos se hinchan y finalmente estallan, dispersando las moléculas de almidón en la solución. Durante este proceso de "gelatinización" hay un aumento espectacular en la viscosidad. Como el nivel de sólidos es de 30-40% en un proceso industrial típico, el almidón tiene que ser diluido o "licuado" de modo que puede ser manejado. Esta reducción en la viscosidad se obtiene hoy principalmente por degradación enzimática. Durante el paso de licuefacción, el almidón de cadena larga se degrada en unidades lineales y más pequeñas ramificadas (maltodextrinas) por una alfa-amilasa. El proceso de licuefacción se realiza típicamente a aproximadamente 105-110°C durante aproximadamente de 5 a 10 minutos seguidos de aproximadamente a 1-2 horas a aproximadamente 95°C. La temperatura se disminuye luego a 60°C, una glucoamilasa o una beta-amilasa y opcionalmente una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa se agregan, y el proceso de sacarificación sigue durante aproximadamente 24 a 72 horas.

[0006] Será evidente de la discusión anterior que el proceso de conversión de almidón convencional consume mucha energía debido a los requisitos diferentes en cuanto a temperatura durante los distintos pasos. Es así deseable poder seleccionar y/o diseñar las enzimas usadas en el proceso de modo que el proceso total puede ser realizado sin tener que gelatinizar el almidón. Tales procesos son el sujeto de las patentes US4591560, US4727026 y US4009074 y EP0171218, y la solicitud de patente danesa 2003 00949. La presente invención divulga una nueva enzima híbrida y una modificación genética de una enzima de tipo salvaje diseñada para este tipo de procesos y comprendiendo una secuencia de aminoácidos de un CBM y una secuencia de aminoácidos de una enzima degradante de almidón fúngica. Enzimas híbridas son el sujeto de WO9814601, WO0077165 y solicitud de patente danesa 2003 00949.

[0007] Kaneko *et al.* *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 81, No 4, p. 292-298, 1996, se refiere clonación y determinación de la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una alfa-amilasa ácida estable derivada de *Aspergillus kawachii* comprendiendo un módulo catalítico y un módulo de unión a carbohidratos.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] La invención proporciona en un primer aspecto una enzima híbrida que comprende una secuencia de aminoácidos de un módulo catalítico y una secuencia de aminoácidos de un módulo de unión a carbohidratos tal y como se define en la reivindicación 1.

[0009] En otros aspectos, la invención proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la enzima híbrida del primer aspecto, una construcción de ADN comprendiendo la secuencia de ADN que codifica la enzima híbrida del primer aspecto, un vector de expresión comprendiendo la secuencia de ADN que codifica la enzima híbrida del primer aspecto,

y una célula huésped transformada con un vector; esta célula huésped es capaz de expresar la secuencia de ADN que codifica la enzima híbrida del primer aspecto.

[0010] En otro aspecto la invención proporciona un método para almidón licuefactante, donde un sustrato de almidón gelatinizado o granular se trata en medio acuoso con la enzima híbrida del primer aspecto de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0011] El término "almidón granular" se entiende como almidón crudo sin cocer, es decir, almidón que no ha sido sometido a una gelatinización. El almidón se forma en plantas como gránulos ínfimos insolubles en agua. Estos gránulos se conservan en almidones a temperaturas inferiores a la temperatura de gelatinización inicial. Cuando se pone en agua fría, los granos pueden absorber una pequeña cantidad del líquido. Hasta de 50°C a 70°C el hinchamiento es reversible, el grado de reversibilidad depende del almidón particular. Con temperaturas más altas un hinchamiento irreversible llamado gelatinización empieza.

[0012] El término "temperatura de gelatinización inicial" se entiende como la temperatura mínima en la que gelatinización del almidón comienza. Almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y puede determinarse fácilmente por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según las especies de planta, la variedad particular de las especies de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención la temperatura de gelatinización inicial de un almidón dado es la temperatura en la que birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón que usan el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., *Starch/Stärke*, Vol. 44 (12) pp. 461-466 (1992).

[0013] El término "hidrolizado de almidón soluble" se entiende como los productos solubles de los procesos de la invención y puede comprender mono-, di- y oligosacáridos, tales como glucosa, maltosa, maltodextrinas, ciclodextrinas y cualquier mezcla de estas. Preferiblemente al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% o 98% de los sólidos secos del almidón granular se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

[0014] El término "homología" de polipéptido se entiende como el grado de identidad entre dos secuencias que indican una derivación de la primera secuencia desde la segunda. La homología puede determinarse adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica tal como GAP proporcionado en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-453). Los siguientes ajustes para comparación de secuencia de aminoácidos se usan: penalización de creación de GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1. La parte pertinente de la secuencia de aminoácidos para la determinación de homología es el polipéptido maduro, es decir, sin el péptido señal.

Enzimas híbridas

[0015] La presente invención se refiere a enzimas híbridas tal y como se define en la reivindicación 1. Números de clasificación enzimáticos (números EC) referidos en la presente especificación con reivindicaciones están en conformidad con *Recommendations* (1992) del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry y *Molecular Biology*, Academic Press Inc, 1992.

[0016] Enzimas híbridas o unas enzimas de tipo salvaje genéticamente modificadas, como denominadas en este caso, incluyen especies comprendiendo una secuencia de aminoácido de una enzima alfa-amilolítica (EC 3.2.1.1) enlazada (es decir, unida de manera covalente) a una secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos (CBM).

[0017] Enzimas híbridas conteniendo CBM, al igual que descripciones detalladas de la preparación y purificación de estas, se conocen en la técnica [ver, por ejemplo, WO 90/00609, WO 94/24158 y WO 95/16782, al igual que Greenwood *et al. Biotechnology and Bioengineering* 44 (1994) pp. 1295-1305]. Pueden, por ejemplo, prepararse por transformación en una célula huésped de una construcción de ADN comprendiendo al menos un fragmento de ADN que codifica el módulo de unión a carbohidratos ligado, con o sin un enlazador, a una secuencia de ADN que codifica la enzima de interés, y cultivando la célula huésped transformada para expresar el gen fundido. El producto resultante recombinante (enzima híbrida), frecuentemente referida a en la técnica como un "proteína de fusión", puede describirse por la siguiente fórmula general:

A-CBM-MR-X

[0018] En la fórmula anterior, un-CBM es la región N-terminal o C-terminal de una secuencia de aminoácidos comprendiendo al menos el módulo de unión a carbohidratos (CBM) *per se*. MR es la región mediana (el "enlazador") y X es la secuencia de residuos de aminoácidos de un polipéptido codificado por una secuencia de ADN que codifica la enzima (o otra proteína) al que el CBM debe unirse.

[0019] La fracción A puede estar bien ausente (de manera que un-CBM es un CBM *per se*, es decir, no comprende ninguno de los residuos de aminoácidos otros que aquellos que constituyen el CBM) o puede ser una secuencia de uno o más residuos de aminoácido (funcionando como una extensión terminal del CBM *per se*). El enlazador (MR) puede ser un enlace, o un grupo de conexión corto comprendiendo de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos de carbono, en particular, de 2 a 40 átomos de carbono. No obstante, el MR es preferiblemente una secuencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de 2 a 40 residuos de aminoácidos, tal como de 2 a 15 residuos de aminoácidos.

[0020] La fracción X puede constituir la región N-terminal o C-terminal de la enzima híbrida global.

[0021] Será así evidente como arriba que el CBM en una enzima híbrida del tipo en cuestión puede situarse C-terminalmente, N-terminal o internamente en la enzima híbrida.

Secuencia enlazadora

[0022] La secuencia enlazadora puede ser cualquier secuencia enlazadora adecuada. En formas de realización preferidas, la secuencia enlazadora deriva de AMG de *Athelia rolfsii*, del AMG de *A. niger* o de la alfa-amilasa de *A. kawachii* tal como una secuencia enlazadora seleccionada de la lista que consiste en enlazador AMG de *A. niger*: T G G T T T T A T P T G S G S V T S T S K T T A T A S K T S T S T S S T S A (SEC ID NO:26), enlazador de alfa-amilasa de *A. kawachii*: T T T T T T A A A T S T S K A T T S S S S S S A A A T T S S S (SEC ID NO:27), enlazador AMG de *Atalia rolfsii*: G A T S P G G S S G S (SEC ID NO:28), y el enlazador PEPT: P E P T P E P T (SEC ID NO:29). En otra forma de realización preferida, las enzimas híbridas tienen una secuencia enlazadora que difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID NO:26, SEC ID NO:27, SEC ID NO:28, o SEC ID NO:29 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.

Módulos de unión a carbohidratos

[0023] 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 exclusivamente, a una forma insoluble en agua (incluyendo cristalino) de esta.

[0024] CBM derivados de enzimas que degradan almidón son frecuentemente referidos como módulos de unión a almidón o SBM (CBM que pueden ocurrir en determinadas enzimas amilolíticas, tales como glucoamilasas determinadas, o en enzimas tales como ciclodextrin glucanotransferasas, o en alfa-amilasas). Asimismo, otras subclases de CBM abarcarían, por ejemplo, módulos de enlace de celulosa (CBM de enzimas celulolíticas), módulos de unión de quitina (CBM que típicamente ocurren en quitinasas), módulos de unión de xilano (CBM que típicamente ocurren en xilanasas), módulos de unión de manano (CBM que típicamente ocurren en mananasas). SBM son frecuentemente referidos como SBD (dominios de unión de almidón)

[0025] CBM se encuentran como partes integrales de polipéptidos grandes o proteínas que consisten en dos o más regiones de secuencia de aminoácidos de polipéptidos, especialmente en enzimas hidrolíticas (hidrolasas) que típicamente comprenden un módulo catalítico con el sitio activo para hidrólisis de sustrato y un módulo de unión a carbohidratos (CBM) para unión al sustrato del carbohidrato en cuestión. Tales enzimas pueden comprender más de un módulo catalítico y uno, dos o tres CBM, y opcionalmente además comprenden una o más regiones de secuencia de aminoácidos de polipéptidos que conectan el CBM(s) con el módulo(s) catalítico, una región del último tipo normalmente denominado "enlazador". Ejemplos de enzimas hidrolíticas comprendiendo un CBM, algunos de los cuales ya se han mencionado anteriormente, son celulasas, xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, acetilesterasas y quitinasas. CBM se han encontrado también en algas, por ejemplo, estarle en la alga roja *Porphyra purpurea* en forma de una proteína de unión de polisacáridos no hidrolítica.

[0026] En la proteínas/polipéptidos en los que CBM ocurren (p. ej. enzimas, típicamente enzimas hidrolíticas), un CBM se puede localizar en el N o C terminal o en una posición interna.

[0027] Esta 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 familia 20" o un módulo CBM-20 se define en el contexto de esta invención como una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos con al menos 45% de homología al 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 de aminoácido 582 a aminoácido 683. La numeración de familias de hidrolasa glucósida aplicada en esta descripción sigue el concepto de Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) CAZy - servidor Carbohydrate-Active Enzymes en la URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/?cazy/CAZY/index.html> o alternativamente Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 1999; *The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach*. 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 , and Bourne, Y. & Henrissat, B. 2001; *Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules*, *Current Opinion in Structural Biology* 11:593-600.

[0028] Ejemplos de enzimas que comprenden un CBM son alfa-amilasas, alfa-amilasas maltogénicas, celulasas, xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, acetilesterasas y quitinasas. Además, CBM incluyen CBM que derivan de glucoamilasas (EC 3.2.1.3) o de CGTasas (EC 2.4.1.19).

[0029] A este respecto, técnicas adecuadas para el aislamiento de los genes pertinentes se conocen bien en la técnica.

[0030] Preferido para la invención es CBM de módulo de unión a carbohidratos de familia 20. CBM de módulo de unión a carbohidratos de familia 20 adecuados para la invención se pueden derivar de la alfa-amilasa de *Aspergillus kawachii* (EMBL:#AB008370) al igual que CBM teniendo al menos 90% de homología a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO:6.

[0031] Una vez que una secuencia de nucleótidos que codifica la región de enlace de sustratos (enlace de carbohidratos) ha sido identificada, bien como ADNc o ADN cromosómico, puede luego ser manipulada en una variedad de vías para fundir esta a una secuencia de ADN que codifica la enzima de interés. El fragmento de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de unión a carbohidratos y el ADN que codifica la enzima de interés se ligan luego con o sin un enlazador. El ADN ligado resultante puede luego ser manipulado en una variedad de vías para conseguir la expresión.

Secuencia alfa-amilolítica

[0032] Según la invención el dominio catalítico es una alfa-amilasa que se puede derivar de *Aspergillus niger* que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:8

[0033] Una enzima híbrida de la invención consiste en el módulo catalítico de alfa-amilasa ácida de *A. niger* con la secuencia mostrada en la SEC ID NO:8 y el enlazador de alfa-amilasa de *A. kawachii* y CBM (SEC ID NO:6).

Vectores de expresión

[0034] 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 traduccionales y transcripcionales de parada. Los varios ADN y secuencias de control anteriormente descritos pueden juntarse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir 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 una construcción 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 se une operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión, y posiblemente secreción.

[0035] 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 puede 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 debe ser introducido. Los vectores puede 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 autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado. El sistema de vector puede ser un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

Marcadores

[0036] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables, que permiten selección fácil de células transformadas. Una etiqueta seleccionable es un gen, el producto del cual proporciona para resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia para auxótrofos y similares.

[0037] Ejemplos de marcadores seleccionables para uso en una célula huésped de hongo filamentoso pueden ser seleccionados del grupo incluyendo, pero no limitado a, amdS (acetamidasa), argB (ornitina-carbamoiltransferasa), bar (fosfonitricina acetiltransferasa), hygB (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato-reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa), trpC (antranilato sintasa), y marcadores de resistencia de glufosinato, al igual que equivalentes de otras especies. Preferido para uso en una célula de *Aspergillus* son los marcadores amdS y pyrG de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el marcador de bar de *Streptomyces hygroscopicus*. Además,

selección se puede realizar por cotransformación, por ejemplo, como se describe en WO 91/17243, donde el marcador seleccionable está sobre un vector separado.

[0038] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento(s) que permite integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma de la célula.

[0039] Los vectores de la presente invención se pueden integrar en el genoma de la célula huésped cuando se introducen en una célula huésped. Para integración, el vector puede depender de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés o cualquier otro elemento del vector para integración estable del vector en el genoma por homólogos o ninguna recombinación homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de ADN adicionales para dirigir integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de ADN adicionales permiten al vector integrarse en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa en el cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían preferiblemente contener un número suficiente de ADN, tal como de 100 a 1500 pares de bases, preferiblemente de 400 a 1500 pares de bases, y de forma más preferida de 800 a 1,500 pares de bases, que son altamente homólogos a la secuencia blanco correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia blanco en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de ADN codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no-homóloga. Estas secuencias de ADN pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a una secuencia blanco en el genoma de la célula huésped, y, además, pueden ser secuencias codificantes o no codificantes.

[0040] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo al vector replicar de manera autónoma en la célula huésped en cuestión.

[0041] El episómico replicando el AMA1 vector plásmido descrito en WO 00/24883 se puede usar.

[0042] Más de una copia de una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se puede insertar en la célula huésped para amplificar expresión de la secuencia de ADN. Amplificación estable de la secuencia de ADN se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped usando métodos bien conocidos en la técnica y selección para transformantes.

[0043] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York*).

Células huésped

[0044] La célula huésped de la invención, bien comprendiendo una construcción de ADN o un vector de expresión comprendiendo la secuencia de ADN que codifica la enzima híbrida o una enzima de tipo salvaje genéticamente modificada, se usa ventajosamente como una célula huésped en la producción recombinante de la enzima híbrida 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 la construcción de ADN de la invención codificando la enzima híbrida o una enzima de tipo salvaje genéticamente modificada, convenientemente integrando la construcción de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Integración de la construcción de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga.

[0045] La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota apropiada, por ejemplo, una célula bacteriana, una célula de hongo filamentoso, una célula vegetal o una célula mamífera.

[0046] En una forma de realización preferida, la célula huésped es un hongo filamentoso representado por los siguientes grupos de *Ascomycota*, incluyendo, por ejemplo, *Neurospora*, *Eupenicillium* (= *Penicillium*), *Emericella* (= *Aspergillus*), *Eurotium* (= *Aspergillus*).

[0047] En una forma de realización más preferida, el hongo filamentoso incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define por Hawksworth *et al.* en *Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK*). Los hongos filamentosos se caracterizan por el hecho de un micelio vegetativo compuesto por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. Crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico.

[0048] En una forma de realización aún más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de una especie de, pero no limitado a, una célula seleccionada del grupo que consiste en una cepa de una especie de *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii*, o una cepa de *Bacillus*, o una cepa de *Fusarium*, tal como una cepa de *Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum* (en el estado perfecto llamada *Gibberella zeae*, previamente *Sphaeria zeae*, sinónimo de *Gibberella roseum* y *Gibberella roseum f.*

sp. cerealis), o *Fusarium sulphureum* (en el estado perfecto llamada *Gibberella zeae*, sinónimo de *Gibberella puricaris*, sinónimo de *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bacridioides*, *Fusarium sambucium*, *Fusarium roseum* y *Fusarium roseum* var. *graminearum*), *Fusarium cerealis* (sinónimo de *Fusarium crookwellense*), o *Fusarium venenatum*.

5 [0049] En una forma de realización más preferida, la célula huésped de hongo filamentoso es una célula de una cepa de una especie de *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus oryzae*, o *Aspergillus niger*.

10 [0050] La célula huésped puede ser una célula huésped de hongo filamentoso de tipo salvaje o una variante, un mutante o una célula huésped de hongo filamentoso genéticamente modificada. En una forma de realización preferida de la invención, la célula huésped es una proteasa deficitaria o cepa menos de proteasa. También específicamente contemplado es cepas de *Aspergillus*, tales como cepas de *Aspergillus niger*, genéticamente modificadas para disgregar o reducir expresión de glucoamilasa, alfa-amilasa ácida estable, alfa-1,6 transglucosidasa y actividades de proteasa.

Transformación de células huésped de hongo filamentoso

15 [0051] Células huésped de hongo filamentoso se pueden transformar por un proceso implicando formación de protoplasto, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular en una manera conocida en la técnica. Procedimientos adecuados para transformación de células huésped de *Aspergillus* se describen en EP 238 023, EP 184 438, y Yelton *et al.* 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:1470-1474. Un método
20 adecuado de transformación de especies de *Fusarium* se describe por Malardier *et al.* 1989, *Gene* 78:147-156 o US 6,060,305.

Aislamiento y clonación una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa progenitora

25 [0052] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de estos. La clonación de las secuencias de ADN de la presente invención de tal ADN genómico puede efectuarse, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR) bien conocida o selección de anticuerpos de bibliotecas de
30 expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Ver, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, *PCR: A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York. Otros procedimientos de amplificación de AND tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencia de ADN (NASBA) pueden utilizarse.

35 [0053] La secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa progenitora se puede aislar de cualquier célula o microorganismo que produce la alfa-amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Primero, un ADN genómico y/o genoteca de ADNc debería ser construido usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la alfa-amilasa que va a ser estudiada. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa se conoce, sondas oligonucleótidas marcadas se pueden sintetizar y usar para identificar clones codificadores de alfa-amilasa de una genoteca genómica obtenida a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de
40 oligonucleótidos marcada con secuencias homólogas a otro gen de alfa-amilasa conocido podría usarse como una sonda par identificar clones codificadores de alfa-amilasa, usando hibridación y condiciones de lavado de astringencia muy baja a muy alta.

45 [0054] Otro método para identificar clones codificadores de alfa-amilasa implicaría insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar las bacterias negativas de alfa-amilasa con la biblioteca de ADN genómico resultante, y luego colocar placas de bacterias transformadas sobre agar con un sustrato para alfa-amilasa (es decir. maltosa), permitiendo así a los clones expresar la alfa-amilasa para ser identificada.

50 [0055] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforamidita descrito por Beaucage y M.H. Caruthers, (1981), *Tetrahedron Letters* 22, p. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.* (1984), *EMBO J.* 3, p. 801-805. En el método de fosforamidita, oligonucleótidos son sintetizados, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, purificado anillado, ligado y clonado en vectores apropiados.

55 [0056] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen genómico mezclado y sintético, sintético mezclado y de origen de ADNc o genómico mezclado y de origen de ADNc, preparado por fragmentos ligantes de sintético, genómico o de origen de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia de ADN entera), conforme a técnicas estándar. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en US 4,683,202 o R.K. Saiki *et al.* (1988), *Science* 239, 1988, pp. 487-491.
60

Secuencia de ADN aislada

[0057] La presente invención se refiere, entre otras cosas, a una secuencia de ADN aislada comprendiendo una
65 secuencia de ADN que codifica una enzima híbrida de la invención.

[0058] El término "secuencia de ADN aislada", como se utiliza en este caso, se refiere a una secuencia de ADN, que está esencialmente libre de otras secuencias de ADN, por ejemplo, al menos aproximadamente 20% pura, preferiblemente al menos aproximadamente 40% pura, más preferiblemente al menos aproximadamente 60% pura, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 80% pura, y de forma más preferida al menos aproximadamente 90% pura, como determinado por electroforesis de agarosa.

[0059] Por ejemplo, una secuencia de ADN aislada se puede obtener por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para reemplazar la secuencia de ADN de su ubicación natural a un sitio diferente donde esta será reproducida. 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 se replicarán. Una secuencia de ADN aislada se puede manipular en una variedad de vías para proveer para expresión del polipéptido de interés. Manipulación de la secuencia de ADN antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de ADN utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

Construcción de ADN

[0060] La presente invención se refiere, entre otras cosas, a una construcción de ADN comprendiendo una secuencia de ADN que codifica una enzima híbrida de la invención. "Construcción de ADN" se define aquí como una molécula de ADN, bicatenaria o bien monocatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ADN, que se combinan y superponen en cierto modo, que de otra manera no existiría en la naturaleza. El término construcción de ADN es sinónimo del término *cassette* de expresión cuando la construcción de ADN contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

Tratamiento del almidón

[0061] La enzima híbrida del primer aspecto de la invención puede en un aspecto usarse en un método para almidón licuefactante, donde un sustrato de almidón gelatinizado o granular se trata en medio acuoso con la enzima híbrida. Preferiblemente el proceso comprendiendo hidrólisis de un compuesto acuoso de almidón gelatinizado o granular, en particular, hidrólisis de almidón granular en un hidrolizado de almidón soluble a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granular.

[0062] En una forma de realización preferida, el compuesto acuoso de almidón además de estar en contacto con la enzima híbrida del primer aspecto de la invención, contacta con una enzima seleccionada de la lista 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, además una alfa-amilasa tipo Termamyl o una enzima desramificante, tal como una isoamilasa (E.C. 3.2.1.68) o unas pululanases (E.C. 3.2.1.41) se añade. En el contexto de la presente invención, una alfa-amilasa tipo Termamyl es una alfa-amilasa tal y como se define en WO99/19467 en la página 3, línea 18 a página 6, línea 27.

[0063] El compuesto acuoso de almidón para ser sometido al método de la invención puede tener 20-55% de almidón granular sólido seco, preferiblemente 25-40% de almidón granular de sólido seco, más preferiblemente 30-35% de almidón granular de sólido seco.

[0064] Después de ser sometido al método de la invención, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o preferiblemente al menos 99% de los sólidos secos del almidón granular se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

[0065] Según la invención, el método de la invención se lleva a cabo a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente la temperatura en la que 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.

[0066] El pH en el que el método de la invención se lleva a cabo puede estar en el intervalo de 3,0 a 7,0, preferiblemente de 3,5 a 6,0, o más preferiblemente de 4,0-5,0.

[0067] El almidón granular para ser procesado en el método de la invención puede, en particular, ser obtenido de tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cereales o grano entero. Más específicamente, el almidón granular se puede obtener de granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judía, plátano o patatas. Especialmente contemplado son ambos tipos no cerosos y cerosos de maíz y cebada. El almidón granulado para ser procesado puede tener una calidad de almidón altamente refinado, preferiblemente al menos 90%, al

menos 95%, al menos 97% o al menos 99,5 % puro o este puede ser un almidón más crudo con material comprendiendo grano molido entero 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 además tratamiento. Dos procesos de la molienda se prefieren según la invención: molienda húmeda y en seco. En la molienda en seco la avellana entera se muele y se usa. La molienda húmeda da una buena separación de germen y comida (gránulos de almidón y proteína) y se aplica con unas pocas excepciones en lugares donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de jarabes. Ambas molienda húmeda y en seco son bien conocidas en la técnica de tratamiento de almidón y se contemplan igualmente para el proceso de la invención. También sémola de maíz y, preferiblemente, sémola de maíz molida se pueden aplicar.

[0068] En una forma de realización del método de la invención la enzima híbrida se usa en un proceso para la producción de combustible o etanol potable comprendiendo contacto del almidón tratado con una levadura. Preferiblemente el proceso comprende fermentación con una levadura realizada simultáneamente o separadamente/secuencial a la hidrólisis del compuesto acuoso de almidón granular. Cuando la fermentación se realiza simultánea a la hidrólisis la temperatura está preferiblemente entre 30°C y 35°C, y más preferiblemente entre 31 °C y 34°C.

[0069] La glucosa puede fermentarse también en otros productos de fermentación, tales como ácido cítrico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, cetonas, aminoácidos, tales como ácido glutámico (monoglutaminato de sodio), pero también compuestos más complejos tales como antibióticos, tal como penicilina, tetraciclina, enzimas, vitaminas, tales como riboflavina, B12, beta-caroteno, hormonas, que son difíciles de producir sintéticamente.

Productos a base de masa

La enzima híbrida de la invención se puede utilizar para la preparación de un producto comestible a base de masa.

[0070] La masa generalmente comprende harina (particularmente harina de trigo) y agua. La masa se leuda, por ejemplo, añadiendo agentes de leudado químicos o levadura, normalmente *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera).

[0071] El producto a base de masa se hace por leudado y calefacción de la masa, por ejemplo, por cocción o vaporización. Ejemplos son pan horneado o al vapor (en particular blanco, integral o pan de centeno), típicamente en forma de galletas o rollos.

[0072] La masa puede comprender una o más enzimas adicionales, por ejemplo, una segunda amilasa (p. ej. una alfa-amilasa maltogénica), una ciclodextrin glucanotransferasa, una proteasa o peptidasa, en particular, una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una fosfolipasa, una celulasa, una hemicelulasa (p. ej. un pentosanasa o xilanasa), una glicosiltransferasa, un enzima ramificadora o una oxidasa tal como glucosa-oxidasa o una oxidasa con actividad más alta en la maltosa que en la glucosa.

[0073] La enzima híbrida se puede utilizar en una dosificación inferior que el módulo catalítico con actividad de alfa-amilasa usado solo (comparado en una base de peso).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material comprado

[0074] Enzimas para manipulaciones de ADN (p. ej. restricción de endonucleasas, ligasas etc.) son obtenibles de New England Biolabs, Inc. y se usaron según las instrucciones del fabricante. Plásmidos amplificados fueron recuperados con equipo Qiagen® Plasmid (Qiagen). Reacción en cadena de polimerasa (PCR) se efectuó con sistema Expand™ PCR (Roche). Equipo de extracción de gel QIAquick™ (Qiagen) se usó para purificación de fragmentos de PCR y fragmentos de ADN cortados a partir de geles de agarosa.

Cepas y plásmidos

[0075] La cepa de *Aspergillus kawachii* IFO4308 se usó como donante de CBM y secuencias enlazadoras. La cepa de *Aspergillus niger* DSM 2761 donó la secuencia amilolítica (WO89/01969). La cepa de *Aspergillus niger* MBin120 descrita en la solicitud de patente provisional US n°. 60/459902 (10345.000-US) fue usada como cepa huésped. El plásmido de expresión de *Aspergillus* pMT2188 descrito en la patente WO200295014 fue usado como vector. La cepa defectuosa de *Escherichia coli* DB6507 (ATCC 35673) fue usada para propagación de pHUda381 y pHUda387.

[0076] Plásmido pMT2188 consiste en un *cassette* de expresión basado en el promotor II de amilasa neutral de *Aspergillus niger* fusionada a la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de amiloglicosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También presente en el plásmido está el marcador selectivo de *Aspergillus* amdS de *Aspergillus nidulans* que permite crecimiento en la acetamida como fuente de nitrógeno solo y el marcador URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* que permite crecimiento de la cepa defectuosa de

Escherichia coli pyrF DB6507 (ATCC 35673), que propaga pHUda381 y pHUda387. Transformación en *E. coli* DB6507 usando el gen de *S. cerevisiae* URA 3 como marcador selectivo se hizo de la siguiente manera:

[0077] *E. coli* DB6507 se hizo competente por el método de Mandel y Higa (Mandel, M. and A. Higa (1970) *J. Mol. Biol.* 45, 154). Transformantes se seleccionaron en el medio M9 sólido (Sambrook *et. al* (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual*, 2. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press) complementado con 1 g/l de casaminoácidos, 500 µl/l de tiamina y 10 mg/l de canamicina.

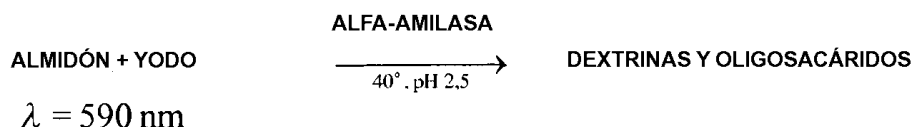
Medios y sustratos

[0078] Cove se compuso por 342,3 g/L de sacarosa, 20 ml/L de solución salina COVE, 10mM de acetamida y 30 g/L de agar noble. Cove-2 se compuso por 30 g/L de sacarosa, 20 ml/L de solución salina COVE, 10mM de acetamida y 30 g/L de agar noble. Solución salina COVE se compuso por 26 g/L de KCl, 26 g/L de MgSO₄·7H₂O, 76 g/L de KH₂PO₄ y 50ml/L de metales traza Cove. Metales traza COVE se compusieron por 0,04 g/L de Na₂B₄O₇·10 H₂O, 0,4 g/L de CuSO₄·5H₂O, 1,2 g/L de FeSO₄·7H₂O, 1,0 g/L de MnSO₄·H₂O, 0,8 g/L de Na₂MoO₄·2H₂O y 10 g/L de ZnSO₄·7H₂O-YPG se compuso por 4 g/L de extracto de levadura, 1 g/L de K₂HPO₄, 0,5 g/L de MgSO₄·7H₂O y 15 g/L de glucosa, pH 6,0. STC se compuso por 0,8 M de Sorbitol, 25 mM de Tris pH 8 y 25 mM de CaCl₂. STPC se compuso por 40 % de PEG4000 en el tampón STC. Agarosa superior Cove se compuso por 342,3 g/L de sacarosa, 20 ml/L de solución salina COVE, 10mM de acetamida y 10 g/L de agarosa de baja fusión. MLC se compuso por 40 g/L de glucosa, 50 g/L de polvo de semilla de soja, 4 g/L de ácido cítrico, pH 5,0. GO-50 se compuso de glucosa 50 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄·7aq 2 g/L, K₂SO₄ 3 g, ácido cítrico 3 g/L, ácido oxálico 50 g/L, solución de metal traza AMG 0,5 mL y urea 3 g/L, pH 5,0. Solución de metal traza AMG se compuso por 6,8 g/L de ZnCl₂·7H₂O, 2,5 g/L de CuSO₄·5H₂O, 0,24 g/L de NiCl₂·6H₂O, 13,9 g/L de FeSO₄·7H₂O, 13,5 g/L de MnSO₄·H₂O y 3 g/L de ácido cítrico.

Actividad de alfa-amilasa ácida estable

[0079] Cuando se usa según la presente invención la actividad de cualquier alfa-amilasa ácida estable se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácidas fúngicas), que se determinan en relación a un estándar enzimático. 1 FAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándar mencionadas más adelante.

[0080] Alfa-amilasa ácida estable, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucan-glucanohidrolasa, E.C. 3,2,1,1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes. La intensidad de color formado con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. Actividad amilasa se determina usando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.



azul/violeta t = 23 seg. decoloración

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0081]

Sustrato:	almidón soluble, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/L
CaCl ₂ :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Intervalo de trabajo enzimático:	0,01-0,04 AFAU/mL

[0082] Una carpeta EB-SM-0259.02/01 describiendo este método analítico con más detalle es disponible bajo pedido a Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta es por la presente incluida por referencia.

Actividad de glucoamilasa

[0083] Actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades de amiloglucosidasa (AGU). La AGU se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

[0084] Un sistema de autoanalizador puede ser utilizado. Mutarotasa se añade al reactivo de dehidrogenasa de glucosa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierte en beta-D-glucosa. Glucosa dehidrogenasa reacciona específicamente con beta-D glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

Incubación AMG:

[0085]

Sustrato:	maltosa 23,2 mM
Tampón:	acetato 0,1 M
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Intervalo de trabajo enzimático:	0,5-4,0 AGU/mL

Reacción de color:

[0086]

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

[0087] Una carpeta ([EB-SM-0131.02/01](#)) describiendo este método analítico con más detalle es disponible bajo pedido de Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta es por la presente incluida por referencia.

Manipulaciones de ADN

[0088] A menos que de otra manera se declare, manipulaciones de ADN y transformaciones se realizaron usando métodos de 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.)

Ejemplo 1: Clonación de módulo de unión a carbohidratos (CBM) de *Aspergillus kawachii*

[0089] Para clonar el módulo de unión a carbohidratos (CBM) con enlazador de *A. kawachii*, los cebadores CBM1 (SEC ID NO:1) y CBM2 (SEC ID NO:2) se diseñaron basados en las secuencias de nucleótidos de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus kawachii* en la base de datos EMBL (EMBL:#AB008370). CBM1 y CBM2 comprenden un sitio de BamHI y un sitio SalI, respectivamente.

CBM1: 5'- gaaggatccgatttttactagtagtacatccaaagccaccac- 3'
 CBM2: 5'- ttgtcgacctacccacgtatcaaccacgtctcc- 3'

[0090] Reacción PCR se efectuó con los cebadores CBM1 y CBM2 usando ADN genómico de *A. kawachii* (IFO4308) como molde. Componentes de reacción (1 ng /microL de ADN genómico, 250 mM d dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U / microL en la polimerasa de Taq en tampón 1X (Roche Diagnostics, Japan) se mezclaron y se sometieron a PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 min
2	92°C	1 min
3	55°C	1 min
4	72°C	1 min
5	72°C	10 min
6	4°C	por siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

[0091] Un fragmento 0,4 kb comprendiendo el CBM con región enlazadora se amplificó. El ADN amplificado se cortó por Sal I y BamH I y se ligó en pMT2188 digerido por Xho I y BamH I para crear pHUda381 teniendo CBM con región enlazadora de *Aspergillus kawachii*, promotor de amilasa neutro de *Aspergillus niger*, secuencias guía TPI de *Aspergillus nidulans*, terminador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y gen *Aspergillus nidulans* amdS como una etiqueta. El pHUda381 fue ordenado para confirmar presencia de CBM correcta con secuencia enlazadora. El CBM con secuencia enlazadora se muestra en SEC ID NO:5.

10 Ejemplo 2: Expresión de la enzima híbrida en *Aspergillus niger*

[0092] La producción de la secuencia de ADNc del gen de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* y el clon de cDNA de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* se describen en WO 8901969 (ejemplo 1 y 3). Una reacción PCR con clon de cDNA de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* como molde fue realizada usando los cebadores (SEC ID NO:3) y (SEC ID NO:4) para introducir un sitio BamHI y un sitio SpeI, respectivamente.

(SEC ID NO:3): 5'- ttggatccaccatgagattatcgacttcgagtctcttc- 3'

(SEQ ID NO:4): 5'- ttactagtagcagcagcagtggtggtcggtgttc- 3'

[0093] Componentes de reacción (1 ng /microL de ADN de molde, 250 mM de dNTP cada uno, cebador 250 nM cada uno, 0,1 U / microL en la polimerasa de Taq en tampón 1X (Roche Diagnostics, Japan) se mezclaron y se sometieron a PCR bajo las siguientes condiciones.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 min
2	92°C	1 min
3	55°C	1 min
4	72°C	2 min
5	72°C	10 min
6	4°C	por siempre

Los pasos 2 a 4 se repitieron 30 veces.

[0094] El fragmento 1,5 kb de ADN amplificado se cortó por Spe I y BamH I y se ligó en pHUda381 digerido por Spe I y BamH I para crear el plásmido de expresión pHUda387 comprendiendo ADNc de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* ADNc fusionado con CBM de *Aspergillus kawachii*. El pHUda387 fue ordenado para confirmar que ninguno de los cambios ocurrió en las secuencias de ADNc de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger*. La secuencia de ADNc de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* se muestra en SEC ID NO:7.

[0095] El pHUda387 fue transformado en *Aspergillus niger* MBin120. La cepa huésped se propagó en 100 ml de medio no selectivo YPG a 32°C durante 16 hrs en un agitador giratorio a 120 r.p.m. Células se recogieron por filtración, se lavaron con 0,6 M de KCl y se resuspendieron en 20 ml de 0,6 M de KCl con un producto de beta-glucanasa comercial (GLUCANEX™, Novozymes A/S) a concentración final de 600 microL /ml. La suspensión fue incubada a 32°C a 80 r.p.m. hasta que protoplastos se formaron, luego se lavaron dos veces con tampón STC. Los protoplastos se contaron con un hematómetro y se resuspendieron y ajustaron en una solución 8:2:0.1 de STC:STPC:DMSO a una concentración final de 2.5×10^7 protoplastos/ml. Aproximadamente 3 microgramos de ADN plásmido se añadieron a 100 microL de suspensión de protoplasto, se incubaron y se mezclaron suavemente en hielo durante 20 min. Un ml de SPTC se añadió y la suspensión de protoplasto se incubó durante 30 min a 37°C. Después de la adición de 10 ml de 50 °C agarosa superior Cove, la reacción fue vertida sobre placas de agar Cove y las placas fueron incubadas a 32°C. Después de 5 días, transformantes fueron seleccionados del medio COVE.

[0096] Los transformantes seleccionados fueron inoculados en 100 ml de medio MLC y cultivados a 30 °C durante 2 días. 10 ml de medio MLC fue inoculado a 100 ml de medio GO-50 y cultivado a 30°C durante 5 días. El sobrenadante se obtuvo por centrifugado.

[0097] La actividad de alfa-amilasa ácida estable en el sobrenadante fue determinada como reducción de color azul de complejo de yodo de almidón medido en OD590nm. 25 microL de muestras enzimáticas se disolvieron en el tampón de muestra (51,4 mM de cloruro de calcio en 2 mM de tampón de citrato [pH 2,5]) se mezcló con 135 microL de solución de sustrato (0,6 g/L de almidón [Merck 1253] y 12 g/L de acetato sódico en 100 mM de tampón de citrato [pH 2,5]) y se incubó a 37°C durante 325 seg. Después de 325 seg, 90 microL de solución de yodo (1,2 g/L de yodo de potasio [Merck 5043] y 0,12 g/L de yodo [Merck 4761]) se añadió a la mezcla reactiva y se incubó a 37°C durante 25 seg. Actividad fue medida a 590 nm en un espectrofotómetro. 25 microL de agua destilada fue usada en vez de muestras enzimáticas en los experimentos de blanco.

Ejemplo 3: Rendimiento de la enzima híbrida en SSF de almidón no gelatinizado

[0098] El rendimiento relativo de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* y alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* con un *Aspergillus niger* con un módulo unido de unión a carbohidratos fue evaluado vía fermentaciones mini-escala SSF (sacarificación simultánea y fermentación). Las dosificaciones usadas fueron 0,3, 0,5 y 1,0 AFAU/g DS de la alfa-amilasa respectiva complementada con una dosis 0,5 AGU/g DS de glucoamilasa de *Aspergillus niger* purificada. Brevemente, aproximadamente 1,9 g de maíz molido (amarillo #2 maíz molido dentado en un molino triturador escala de piloto y pasado a través de un 2 mm de pantalla, 11,2% de contenido de humedad) se añadió a tubos 16 ml de poliestireno (Falcon 352025). Una solución de 0,02 de N H₂SO₄ con 3 mg/ml de penicilina fue añadida en una cantidad apropiada para llevar el nivel de sólidos secos (DS) a 34% y el pH a 5,0. Los tratamientos se hicieron en seis repeticiones.

[0099] Después de dosificación de las enzimas, los tubos fueron inoculados con 4,74 x 10⁸ de levadura células/ml. Los tubos se cubrieron con un destornillador en la tapa que ha sido punzada con una aguja muy pequeña para permitir liberación de gas y agitados brevemente antes de pesaje e incubación a 32°C. Progreso de fermentación fue seguido por pesaje de los tubos según avanzaba el tiempo. Tubos fueron removidos brevemente antes de pesaje. La relación usada entre cantidad de pérdida de CO₂ y el peso de etanol fue: pérdida de CO₂ (g) x 1,045 = EtOH (g). Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Rendimiento de etanol medio como g etanol/g ds después de 50 hrs.

Dosis (AFAU/g DS)	alfa-amilasa de <i>Aspergillus niger</i>	alfa-amilasa+CBM de <i>Aspergillus niger</i>
0,3	0,342	0,366
0,5	0,348	0,383
1,0	0,365	0,390
95% límites de confianza: + /- 0,008		

[0100] En una base de actividad igual, alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* con un módulo unido de unión a carbohidratos (híbrido) alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* significativamente superó (nativa) en todas las dosificaciones evaluadas. La enzima híbrida fue aproximadamente tres veces más eficaz que la enzima nativa (es decir, rendimiento de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* podría unirse con aproximadamente tres veces menos alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* con un módulo unido de unión a carbohidratos).

Ejemplo 4: Rendimiento de enzimas híbridas con combinaciones diferentes de CBM, secuencia enlazadora y módulo catalítico

[0101] Variantes de enzima híbrida comprendiendo la alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* (AA) y un CBM de alfa-amilasa de *A. kawachii*, AMG de *A. niger*, AMG de *T. emersonii*, AMG de *Athelia rolfsii*, o alfa-amilasa maltogénica de *Bacillus sp.* (Novamyl) se construyeron. La secuencia enlazadora de alfa-amilasa de *A. kawachii* (SEC ID NO:27) fue usada en todas las variantes.

[0102] El rendimiento de las variantes fue evaluado usando almidón de maíz (SIGMA S-9679) como sustrato, glucoamilasa de *Aspergillus niger* G2 0,5 AGU/g DS, variante 1,0 AFAU/g DS y cuantificación de la glucosa liberada con el equipo Glucose B-test (Wako Pure Chemicals 271-3141). Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento de enzimas híbridas con diferentes CBM. Glucosa mg/ml después de 20, 48, y 68 hrs (1,0 AFAU/gDS)

Variante	Módulo catalítico	Enlazador	SBD	20 hrs	48 hrs	68 hrs
JA001	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	0,18	0,51	1,07
JA002	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>niger</i> AMG	0,38	1,08	1,88
JA003	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>emersonii</i> AMG	0,04	0,19	0,43
JA004	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>rolfsii</i> AMG	0,48	1,43	2,48
JA005	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>bacillus</i> MA	-0,03	-0,04	0,10

5 [0103] Variantes de enzima híbrida comprendiendo la alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* y un CBM de alfa-amilasa de *A. kawachii*, AMG de *A. niger*, o AMG de *Athelia rolfsii*, se construyeron. También variantes con secuencia enlazadora diferente se construyeron. Las secuencias enlazadoras usadas fueron enlazador AMG de *A. niger* (SEC ID NO:26), enlazador de alfa-amilasa de *A. kawachii* (SEC ID NO:27), enlazador AMG de *Athelia rolfsii* (SEC ID NO:28) y el enlazador PEPT (SEC ID NO:29). Una variante con dos CBD en serie se construyó también (JA012).

10 [0104] El rendimiento de las variantes fue evaluado como anteriormente, solo con glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 y la variante fue dosificada como 0,3 AFAU/g DS. Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Rendimiento de enzimas híbridas con secuencias enlazadoras diferentes y módulos catalíticos. Glucosa mg/ml después de 18, 24, y 42 hrs.

Variante	Módulo catalítico	Enlazador	SBD	18 hrs	24 hrs	42 hrs	68 hrs
JA001	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	2,73	4,40	7,01	8,93
JA002	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>niger</i> AMG	2,75	4,30	7,03	9,23
JA004	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>rolfsii</i> AMG	2,91	4,35	7,16	9,11
JA008	<i>Aspergillus niger</i>	<i>niger</i> AMG	<i>niger</i> AMG	3,01	4,26	7,31	8,76
JA009	<i>Aspergillus niger</i>	<i>rolfsii</i> AMG	<i>niger</i> AMG	3,02	4,69	7,60	9,11
JA010	<i>Aspergillus niger</i>	PEPT	<i>niger</i> AMG	3,18	4,66	7,82	9,38
JA011	<i>Aspergillus niger</i>	<i>rolfsii</i> AMG	<i>rolfsii</i> AMG	3,31	4,62	7,49	9,60
JA012	<i>Aspergillus niger</i>	<i>kawachii</i> AA	<i>niger</i> AMG + <i>rolfsii</i> AMG	2,99	4,10	6,97	8,85

15 [0105] Variantes de enzima híbrida comprendiendo el enlazador y CBM de alfa-amilasa de *A. kawachii* con módulos catalíticos diferentes se construyeron. Los módulos catalíticos aplicados fueron de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa de *A. kawachii* o alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* (Fungamyl™). El rendimiento de las variantes fue evaluado como anteriormente, con glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 y la variante dosificada como 0,3 AFAU/g DS. Los resultados se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Rendimiento de enzimas híbridas con módulos catalíticos diferentes. Glucosa mg/ml después de 18, 24, 42 y 68 hrs.

Variante	Módulo catalítico	Enlazador	SBD	18 hrs	24 hrs	42 hrs	68 hrs
JA001	<i>A. niger</i> AA	<i>kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	2,73	4,40	7,01	8,93
JA006	<i>A. oryzae</i> AA	<i>kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	3,39	5,10	7,99	9,77
JA007	<i>A. kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	2,91	3,99	6,82	8,57

20 [0106] Variantes de enzima híbrida comprendiendo el enlazador y CBM de alfa-amilasa de *A. kawachii* o AMG de *A. rolfsii* con módulos catalíticos diferentes de alfa-amilasa ácida estable de *Aspergillus niger* o alfa-amilasa de *Aspergillus*

oryzae (Fungamyl™). El rendimiento de las variantes fue evaluado como anteriormente con glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 y la variante dosificada como 0,3 AFAU/g DS. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Rendimiento de diferentes enzimas híbridas. Glucosa mg/ml después 18, 24 o 42 hrs.						
Variante	Módulo catalítico	Enlazador	SBD	18 hrs	24 hrs	42 hrs
JA001	<i>A. niger</i> AA	<i>kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	4,64	5,61	8,38
JA006	<i>A. oryzae</i> AA	<i>kawachii</i> AA	<i>kawachii</i> AA	6,27	7,93	9,40
JA017	<i>A. oryzae</i> AA	<i>rolfsii</i> AMG	<i>rolfsii</i> AMG	6,68	8,87	9,80

5 Ejemplo 5: Variante de JA017 con una o más sustituciones en el módulo catalítico

[0107] Variantes de la enzima híbrida JA017 (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:40) comprendiendo el AMG de *A. rolfsii* CBM, secuencia enlazadora de *A. rolfsii* y el módulo catalítico de alfa-amilasa de *A. oryzae* con una o más sustituciones en el módulo catalítico se construyeron usando técnicas de ingeniería de proteínas convencionales. La tabla 7 enumera las sustituciones en las variantes.

Tabla 7. Variantes de JA017 (SEC ID NO:40) con una o más sustituciones en el módulo catalítico.

Nº	Sustitución
JA019	Y175W E176D
JA050	N264K M266L
JA056	D253N
JA057	K158D S161 D Q163S D164S G466D D468S N470D
JA059	G60N N264K M266L
JA060	D177N
JA061	K158D S161DQ163S D164S Y175W E176D G466D D468S N470D
JA062	K158D S161DQ163S D164S Y175W E176D N264K M266L G466D D468S N470D
JA063	K158V S161DQ163S D164S G466D D468S N470D
JA069	K158D S161NQ163A D164S G466D D468S N470D
JA074	K158V S161N Q163A D164S N264K M266L G466D D468S N470D
JA076	Q81R K158V S161N Q163A D164S Y175W E176D G466D D468S N470D
JA083	K158D S161DQ163S D164S Y175W E176D N264E M266L G466D D468S N470D
JA085	Q81 R K158V S161N Q163A D164S Y175W E176D D177N N264K M266L G466D D468S N470D
JA093	Q81 R K158V S161N Q163A D164S Y175W E176D D177N N264E M266L G466D D468S N470D
JA094	K158V S161N Q163A D164S Y175W E176D D177N N264K M266L G466D D468S N470D
JA095	K158V S161N Q163A D164S Y175W E176D D177N N264E M266L G466D D468S N470D
JA096	K158V S161N Q163A D164S D177N N264K M266L G466D D468S N470D
JA097	K158V S161N Q163A D164S D177N N264E M266L G466D D468S N470D

[0108] Las variantes fueron expresadas en *Aspergillus oryzae* y caracterizadas para estabilidad de pH, termostabilidad y el rendimiento hacia el almidón crudo por prueba de liberación de glucosa.

[0109] JA085 mostró al menos por 5 °C termostabilidad más alta que JA017 a pH 4,5 fue y estable incluso a pH 3,0.

[0110] Las nuevas variantes JA085 y JA074 mostraron una alta actividad específica en la prueba de liberación de glucosa. JA085 continuó para liberar glucosa incluso a pH 3,8 donde JA017 fue rápidamente inactivada. JA074 tuvo los máximos rendimientos de glucosa a pH 4,0 fue pero fue inactivado a pH 3,8.

[0111] Las tablas 8-10 enumeran la estabilidad de temperatura como actividad residual después de 30 min de incubación a 55°C y 60°C a pH 4,5, la actividad específica, la estabilidad de pH y la actividad en la prueba de liberación de glucosa de varias variantes.

Tabla 8. Estabilidad de temperatura actividad Y específica de variantes PE seleccionadas.

	Estabilidad de temperatura (%)			Actividad específica (mFAU/OD280)
	In 1mM CaCl ₂		Sin CaCl ₂	
	55C°	60°C		
JA017	2	0	0	3157
JA057	12	0	0	
JA061	51	0	16	
JA063	18	0	0	
JA069	16	0	0	
JA074	19	0	0	
JA085	68	20	12	3653
JA095	59	7	2	4240
JA096	53	0	0	
JA097	40	0	0	

Tabla 9a. Estabilidad de temperatura (pH4,5, 1 hora de incubación)

Temp. °C	JA017A	JA085A
35	101	107
40	109	102
45	98	96
50	64	95
55	0	56
60	0	27
65	0	0

Tabla 9b. Estabilidad de pH (32°C, 1 hora de incubación)

pH	JA017A	JA085A
2,5	0	20
3,0	23	76
3,5	74	83
4,0	88	92
4,5	86	95
5,0	96	99
5,5	100	100

Tabla 10a. Rendimiento en la prueba de liberación de glucosa con AMG de *A. niger* G2 purificado a pH 4,0. Glucosa mg/ml.

	0 min	19 min	43 min	67 min	91 min
JA001	0,48	3,48	5,67	8,26	10,79
JA017	0,46	6,45	7,97	8,71	8,98
JA074	0,44	8,85	14,69	18,24	20,29
JA085	0,41	5,87	10,62	13,92	17,34

Tabla 10b. Rendimiento en la prueba de liberación de glucosa con AMG de *A.niger* G2 purificado a pH 3,8. Glucosa mg/ml.

	0 min	19 min	43 min	67 min	91 min
JA001	0,48	3,48	5,67	8,26	10,79
JA017	0,46	6,45	7,97	8,71	8,98
JA074	0,44	8,85	14,69	18,24	20,29
JA085	0,41	5,87	10,62	13,92	17,34

Tabla 11a. Rendimiento en la prueba de liberación de glucosa de AMG de *A. niger* G2 purificado a pH 3,9. Glucosa mg/ml

	0 min	18 min	90 min
JA074	0.41	6.83	16.87
JA085	0.40	4.50	14.08
JA094	0.40	4.48	14.00
JA095	0.40	4.49	13.82

Tabla 11b. Rendimiento en la prueba de liberación de glucosa de AMG de *A. niger* G2 purificado a pH 3,6. Glucosa mg/ml

	0 min	18 min	90 min
JA074	0.43	5.01	7.57
JA085	0.43	4.18	10.61
JA094	0.42	4.18	11.18
JA095	0.42	4.33	11.52

5

Ejemplo 6: Variantes de la alfa-amilasa ácida de *Aspergillus kawachii*

[0112] Una variante de la alfa-amilasa ácida *Aspergillus kawachii* adecuada para hidrólisis de almidón crudo se puede producir por proteína convencional creada genéticamente de la secuencia comprendiendo el módulo catalítico. Posición específica donde alteraciones pueden mejorar actividad específica y/o estabilidad se predijo basada en similitud a una de las siguientes alfa-amilasas fúngicas con la secuencia de aminoácidos indicada y una estructura tridimensional encontrada bajo el identificador indicado en el RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org): la alfa-amilasa ácida de *A. niger* (2aaa, SEC ID NO:42 aquí) y la alfa-amilasa (TAKA amilasa) de *Aspergillus oryzae* (6taa o 7taa, SEC ID NO:43 aquí). Los dos modelos 3D fueron superpuestos alineando los residuos de aminoácidos de cada tríada catalítica. Esto se hizo por métodos conocidos en la técnica basados en las desviaciones de los tres pares de átomos C-alfa, por ejemplo, minimizando la suma de escuadras de las tres desviaciones o alineando para tener cada desviación por debajo de 0,8 Å, por ejemplo, por debajo de 0,6 Å, por debajo de 0,4 Å, por debajo de 0,3 Å o por debajo de 0,2 Å.

[0113] Alternativamente, el superposición puede realizarse alineando las dos secuencias de aminoácidos por un método convencional y minimizando la suma de escuadras de las desviaciones de todos los pares correspondientes de residuos de aminoácidos. El alineamiento de secuencia puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, usando el software GAP de UWGCG versión 8.

[0114] En el alineamiento de las tres alfa-amilasas de *A. kawachii*, *A. niger* (aaa_new) y *A. oryzae* (7taa) mostrado debajo se indican los residuos que están dentro de 10Å del sustrato de acarbosa en la estructura 7taa.pdb. Estos residuos son objetivos para alteraciones que confieren actividad específica mejorada.

ES 2 383 366 T3

kawachi	MRVSTSSIAL	AVSLFGKLAL	GLSAAEWRTQ	SIYFLLTDRF	GRTDNSTTAT	50
aaa_new	MRLSTSSLFL	SVSLLGKLAL	GLSAAEWRTQ	SIYFLLTDRF	GRTDNSTTAT	
7taa			.ATPADWRSQ	SIYFLLTDRF	ARTDGSTTAT	29
				* * *		
kawachi	CNTGDQIYCG	GSWQGIINHL	DYIQGMGFTA	IWISPITEQL	PQDTSDEGEAY	100
aaa_new	CDTGDQIYCG	GSWQGIINHL	DYIQGMGFTA	IWISPITEQL	PQDTADGEAY	
7taa	CNTADQKYCG	GTWQGIIDKL	DYIQGMGFTA	IWITPVTAQL	PQTTAYGDAY	79
	*****			* * *	*****	
kawachi	HGYWQQKIYY	VNSNFGTADD	LKSLSDALHA	RGMVLMVDVV	PNHMGYAGNG	150
aaa_new	HGYWQQKIYD	VNSNFGTADD	LKSLSDALHA	RGMVLMVDVV	PNHMGYAGNG	
7taa	HGYWQQDIYS	LNENYGTADD	LKALSSALHE	RGMVLMVDVV	ANHMGYDGAG	129
	*****			***	*****	
kawachi	NDVDYSVFDP	FDSSSYFHPY	CLITDWDNLT	MVQDCWEGDT	IVSLPDLNNTT	200
aaa_new	NDVDYSVFDP	FDSSSYFHPY	CLITDWDNLT	MVQDCWEGDT	IVSLPDLNNTT	
7taa	SSVDYSVFKP	FSSQDYFHPF	CFIQNYEDQT	QVEDCWLGDN	TVSLPDLDTT	179
			*****	**	*****	
kawachi	ETAVRTIWDY	WVADLVSNS	VDGLRIDSVE	EVEPDFFPGY	QEAAGVYCVG	250
aaa_new	ETAVRTIWDY	WVADLVSNS	VDGLRIDSVE	EVEPDFFPGY	QEAAGVYCVG	
7taa	KDVVKNEWYD	WVGSLSNS	IDGLRIDTVK	HVQKDFWPGY	NKAAGVYICG	229
			*****	**	*	
kawachi	EVDNGNPALD	CPYQKYLDGV	LNYPYIWQLL	YAFESSSGSI	SNLYNMIKSV	300
aaa_new	EVDNGNPALD	CPYQKVLDGV	LNYPYIWQLL	YAFESSSGSI	SNLYNMIKSV	
7taa	EVLGDGPAYT	CPYQNVMDGV	LNYPYIYPLL	NAFKSTSGSM	DDLNMINTV	279
	*****	*	* * *	* * *	*	
kawachi	ASDCSDPTLL	GNFIENHDNP	RFASYTSDYS	QAKNVLSYIF	LSDGIPIVYA	350
aaa_new	ASDCSDPTLL	GNFIENHDNP	RFASYTSDYS	QAKNVLSYIF	LSDGIPIVYA	
7taa	KSDCPDSTLL	GTFVENHDNP	RFASYTNDIA	LAKNVAAFI	LNDGIPIIYA	329
		* * * * *	*		*	
kawachi	GEEQHYSGGD	VPYNREATWL	SGYDTSAELY	TWIATTNAIR	KLAISADSDY	400
aaa_new	GEEQHYSGGK	VPYNREATWL	SGYDTSAELY	TWIATTNAIR	KLAISADSAY	
7taa	GQEQHYAGGN	DPANREATWL	SGYPTDSELY	KLIASANAIR	NYAISKDTGF	379
	*	*****				
kawachi	ITYKNDPIYT	DSNTIAMRKG	TSGSQIITVL	SNKGSSGSSY	TLTSLSGSGYT	450
aaa_new	ITYANDAFYT	DSNTIAMRKG	TSGSQVITVL	SNKGSSGSSY	TLTSLSGSGYT	
7taa	VTYKNWPYK	DDTTIAMRKG	TDGSQIVTIL	SNKGASGDSY	TLTSLSGAGYT	429
kawachi	SGTKLIEAYT	CTSVTVDSNG	DIPVPMASGL	PRVLLPASVV	DSSSLCGGSG	500
aaa_new	SGTKLIEAYT	CTSVTVDSNG	DIPVPMASGL	PRVLLPASVV	DSSSLCGGSG	
7taa	AGQQLTEVIG	CTTVTVGSDG	NVPVPMAGGL	PRVLYPTEKL	AGSKICS...	474
kawachi	NTTTTTTAAT	STSKATTSSS	SSSAAATTSS	SCTATSTTLP	ITFEELVTTT	550
aaa_new	RLYVE.....					505
7taa						
kawachi	YGEEVYLSGS	ISQLGEWHTS	DAVKLSADDY	TSSNPEWSVT	VSLPVGTTTFE	600
aaa_new						
7taa						

```

                                601                                640
kawachi  YKFIKVDEGG SVTWESDPNR EYTVPECGSG SGETVVDTW R      640
aaa_new  .....
7taa     .....

```

[0115] Las alteraciones específicas para actividad específica aumentada es una sustitución o una combinación de sustituciones en las siguientes posiciones dentro del "distancia del sustrato 10Å": 13,15,18,32-36 (es decir, 32, 33, 34, 35, 36), 61,63-64, 68- 69,73-84 (p. ej. 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84).117-125 (p. ej. 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125).152- 158 (p. ej. 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158).161-162, 165-175 (e.g.165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175), 204-211 (p. ej. 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211), 216,229-239 (229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239), 242, 250, 252-253, 255-257 (p. ej. 255, 256, 257).259-260, 275, 292, 295-299 (p. ej. 295, 296, 297, 298, 299), 304, 328, 339-344 según la numeración 7taa en el alineamiento arriba donde el N-terminal es ATPAD en 7taa (TAKA amilasa). Muchas posiciones interesantes son: 33, 36, 74, 75, 77, 120, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 162, 166, 169, 170, 199, 232, 233, 235, 238, 239, 256, 257, 331, 336, 339, 340, y 342. Las sustituciones pueden ser para cualquier residuo de aminoácido.

[0116] Variantes comprendiendo una de las siguientes sustituciones o combinaciones de estas pueden producirse: G33A, I36K, S74A, D75Y, E77D, P120A, I153D, D154N, W155Y, D156E, N157D, L158Q, Q162E, E166L, T169N, I170T, E199K, E199L, D232L, N233D, N235D, L238Y, D239T, W256Y, Q257P, E331Q, S336A, D339K, D339N, V340D, y Y342A. Las variantes más interesantes comprenden una o más de las siguientes sustituciones; S74A, E166L, E199L, D339K, y D156E. Aún más interesante es la variante con las sustituciones múltiples S74A/E166L/E199L.

[0117] Basado en similitud entre alfa-amilasas ácidas de *Aspergillus kawachii* y de *A. niger* las siguientes sustituciones se predijeron para mejorar la actividad específica; N31 D, S74A, Y89D, E209L, Y245V, D348K, D378A, K383A, P386A, I387F, I405V, N448S, y N480R, y una variante llamada WA01 comprendiendo estas sustituciones puede producirse.

Ejemplo 7: Rendimiento de una variante de la alfa-amilasa ácida de *Aspergillus kawachii*

[0118] Las secuencias de los híbridos JA007 y JA001 descritas en el ejemplo 4 son idénticas a respectivamente la secuencia de la alfa-amilasa ácida de *A. kawachii* (SEC ID NO:41) y la secuencia de la variante WA01 descrita en el ejemplo precedente. Como los dos híbridos JA001 y JA007 han sido comparados en diferentes pruebas, la mejora en la actividad específica conferida por las sustituciones en la variante WA01 puede predecirse con mucha precisión. Actividad específica de la variante WA01 será 1,7 a 1,8 veces superior a la actividad específica de la amilasa de *A. kawachii* de tipo salvaje. La predicción se basa en los datos mostrados en la tabla 12.

Tabla 12. Rendimiento del híbrido JA007 (idéntica a alfa-amilasa ácida de *A. kawachii*) y el híbrido JA001 (idéntica a WA01, una variante de la alfa-amilasa ácida de *A. kawachii* comprendiendo las sustituciones N31 D, S74A, Y89D, E209L, Y245V, D348K, D378A, K383A, P386A, I387F, I405V, N448S, y N480R)

	AFAU/ml	mg/ml	AFAU/mg	A280	AFAU/A280
JA001	1,41	0,67	2,11	1,22	1,15
JA007	0,56	0,46	1,22	0,89	0,63

Ejemplo 8: Hidrólisis de almidón crudo con una alfa-amilasa ácida fúngica con o sin CBD

[0119] Este ejemplo ilustra la conversión de almidón de trigo granular o sémola de maíz en la glucosa usando amilasa fúngica ácida sin un CBM (SEC ID NO:8) o el correspondiente híbrido con un CBM (JA001). Un compuesto acuoso con 33% de sólidos secos (DS) de almidón granular se preparó añadiendo 247,5 g de almidón de trigo o sémola de maíz bajo agitación en 502,5 ml de agua. El pH fue ajustado con HCl a 4,5. El compuesto acuoso de almidón granular fue distribuido a matraces 100 ml de tapa azul con 75 g en cada matraz. Los matraces fueron incubados con agitación magnética en un baño maría a 60°C. A cero horas las actividades enzimáticas se dosificaron a los matraces; glucoamilasa (200 AGU/kg DS), una amilasa ácida fúngica (50 AFAU/kg DS) y la alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* de tipo salvaje (SEC ID NO:8) o la alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* pero fusionada a un enlazador y CBM derivado de *A. kawachii* (SEC ID NO:8 fusionado en la SEC ID NO:6). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* w/wo CBM fue dosificada como 100 KNU/kg DS. Las muestras fueron retiradas después de 24, 48, 72 y 96 horas.

[0120] Almidón de sólidos secos totales fue determinado usando el siguiente método. El almidón fue completamente hidrolizado añadiendo una cantidad en exceso de alfa-amilasa (300 KNU/Kg sólidos secos) y colocando la muestra en un baño de aceite a 95 °C durante 45 minutos. Posteriormente las muestras fueron enfriadas a 60°C y una cantidad en exceso de glucoamilasa (600 AGU/kg ds) fue añadida seguido de incubación durante 2 horas a 60°C.

[0121] Sólidos solubles secos en el hidrolizado de almidón fueron determinados por medición de índice de refracción en muestras después de filtración a través de un filtro 0,22 microM. Los perfiles de azúcar fueron determinados por HPLC. La cantidad de glucosa fue calculada como DX.

[0122] Los resultados se muestran en las tablas 13-14 (almidón de trigo) y 15-16 (sémola de maíz).

Tabla 13. Sólidos solubles secos como porcentaje de sustancia seca total de almidón de trigo. Enzimas: glucoamilasa, alfa-amilasa ácida fúngica y más alfa-amilasa ácida fúngica con el CBM o sin el CBM.

	24 horas	46 horas	70 horas	90 horas
Sin CBM	81,1	88,6	89,4	90,7
Con CBM	86,2	92,6	93,7	95,1

Tabla 14. El DX del hidrolizado soluble de almidón de trigo: enzimas: glucoamilasa, amilasa ácida fúngica y más alfa-amilasa ácida fúngica con el CBM o sin el CBM.

	24 horas	46 horas	70 horas	90 horas
Sin CBM	78,1	84,9	85,6	86,7
Con CBM	82,3	88,4	89,5	90,5

Tabla 15. Sólidos solubles secos como porcentaje de sustancia seca total de sémola de maíz. Enzimas: glucoamilasa, alfa-amilasa ácida fúngica y más alfa-amilasa ácida fúngica con el CBM o sin el CBM.

	24 horas	46 horas	70 horas	90 horas
Sin CBM	44,0	49,6	56,8	62,2
Con CBM	53,6	59,7	63,8	68,4

Tabla 16. El DX del hidrolizado soluble de sémola de maíz: enzimas: glucoamilasa, amilasa ácida fúngica y más alfa-amilasa ácida fúngica con el CBM o sin el CBM.

	24 horas	46 horas	70 horas	90 horas
Sin CBM	42,1	47,3	53,9	58,8
Con CBM	51,2	56,8	60,4	64,5

Listado de secuencias

[0123]

5 <110> Udagawa, Hiroaki
Taira, Rikako
Tkagi, Shinobu
Allain, Eric
Hjort, Carsten
10 Vikso-Nielsen, Anders

<120> ENZIMAS HÍBRIDAS PARA TRATAMIENTO DEL ALMIDÓN

<130> 10490.500-US

15 <160> 43

<170> Versión de patentIn 3.2

20 <210> 1
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 1
gaagggatcc gatttttact agtacaacca aagccaccac ???40

30 <210> 2
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador

<400> 2
40 ttgtcgacc tacctccacg tatcaaccac cgtctcc ???37

<210> 3
<211> 39
<212> ADN
45 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 3
50 ttggatcca ccatgagatt atcgacttcg agtctcttc ???39

<210> 4
<211> 38
55 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

60 <400> 4 ttactagta gcagcagcag ttgtggtcgt ggttggtc ???38

<210> 5
<211> 396
65 <212> ADN
<213> Aspergillus kawachii

ES 2 383 366 T3

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(396)

5

<400> 5

act agt aca tcc aaa gcc acc acc tcc tct tct tct tct tct gct gct	48
Thr Ser Thr Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala	
1 5 10 15	
gct act act tct tca tca tgc acc gca aca agc acc acc ctc ccc atc	96
Ala Thr Thr Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile	
20 25 30	
acc ttc gaa gaa ctc gtc acc act acc tac ggg gaa gaa gtc tac ctc	144
Thr Phe Glu Glu Leu Val Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu	
35 40 45	
agc gga tct atc tcc cag ctc gga gag tgg gat acg agt gac gcg gtg	192
Ser Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Glu Trp Asp Thr Ser Asp Ala Val	
50 55 60	
aag ttg tcc gcg gat gat tat acc tcg agt aac ccc gag tgg tct gtt	240
Lys Leu Ser Ala Asp Asp Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val	
65 70 75 80	
act gtg tcg ttg ccg gtg ggg acg acc ttc gag tat aag ttt att aag	288
Thr Val Ser Leu Pro Val Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys	
85 90 95	
gtc gat gag ggt gga agt gtg act tgg gaa agt gat ccg aat agg gag	336
Val Asp Glu Gly Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu	
100 105 110	
tat act gtg cct gaa tgt ggg aat ggg agt ggg gag acg gtg gtt gat	384
Tyr Thr Val Pro Glu Cys Gly Asn Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp	
115 120 125	
acg tgg agg tag	396
Thr Trp Arg	
130	

10

<210> 6
<211> 131
<212> PRT
<213> Aspergillus kawachii

15

<400> 6

Thr Ser Thr Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala
1 5 10 15

ES 2 383 366 T3

Ala Thr Thr Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile
20 25 30

Thr Phe Glu Glu Leu Val Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu
35 40 45

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

Lys Leu Ser Ala Asp Asp Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val
65 70 75 80

Thr Val Ser Leu Pro Val Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys
85 90 95

Val Asp Glu Gly Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu
100 105 110

Tyr Thr Val Pro Glu Cys Gly Asn Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp
115 120 125

Thr Trp Arg
130

<210> 7
<211> 1533
<212> ADN
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1533)

<400> 7

atg aga tta tcg act tcg agt ctc ttc ctt tcc gtg tct ctg ctg ggg 48
Met Arg Leu Ser Thr Ser Ser Leu Phe Leu Ser Val Ser Leu Leu Gly
1 5 10 15

aag ctg gcc ctc ggg ctg tcg gct gca gaa tgg cgc act cag tcg att 96
Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile
20 25 30

tac ttc cta ttg acg gat cgg ttc ggt agg acg gac aat tcg acg aca 144
Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr
35 40 45

gct aca tgc gat acg ggt gac caa atc tat tgt ggt ggc agt tgg caa 192
Ala Thr Cys Asp Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln
50 55 60

ES 2 383 366 T3

gga atc atc aac cat ctg gat tat atc cag ggc atg gga ttc acg gcc Gly Ile Ile Asn His Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala 65 70 75 80	240
atc tgg atc tcg cct atc act gaa cag ctg ccc cag gat act gct gat Ile Trp Ile Ser Pro Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp 85 90 95	288
ggt gaa gct tac cat gga tat tgg cag cag aag ata tac gac gtg aac Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn 100 105 110	336
tcc aac ttc ggc act gca gat gac ctc aag tcc ctc tca gat gcg ctt Ser Asn Phe Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu 115 120 125	384
cat gcc cgc gga atg tac ctc atg gtg gac gtc gtc cct aac cac atg His Ala Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asn His Met 130 135 140	432
ggc tac gcc ggc aac ggc aac gat gta gac tac agc gtc ttc gac ccc Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro 145 150 155 160	480
ttc gat tcc tcc tcc tac ttc cac cca tac tgc ctg atc aca gat tgg Phe Asp Ser Ser Ser Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp 165 170 175	528
gac aac ttg acc atg gtc caa gat tgt tgg gag ggt gac acc atc gta Asp Asn Leu Thr Met Val Gln Asp Cys Trp Glu Gly Asp Thr Ile Val 180 185 190	576
tct ctg cca gac cta aac acc acc gaa act gcc gtg aga aca atc tgg Ser Leu Pro Asp Leu Asn Thr Thr Glu Thr Ala Val Arg Thr Ile Trp 195 200 205	624
tat gac tgg gta gcc gac ctg gta tcc aat tat tca gtc gac gga ctc Tyr Asp Trp Val Ala Asp Leu Val Ser Asn Tyr Ser Val Asp Gly Leu 210 215 220	672
cgc atc gac agt gtc ctc gaa gtc gaa cca gac ttc ttc ccg ggc tac Arg Ile Asp Ser Val Leu Glu Val Glu Pro Asp Phe Phe Pro Gly Tyr 225 230 235 240	720
cag gaa gca gca ggt gtc tac tgc gtc ggc gaa gtc gac aac ggc aac Gln Glu Ala Ala Gly Val Tyr Cys Val Gly Glu Val Asp Asn Gly Asn 245 250 255	768
cct gcc ctc gac tgc cca tac cag aag gtc ctg gac ggc gtc ctc aac Pro Ala Leu Asp Cys Pro Tyr Gln Lys Val Leu Asp Gly Val Leu Asn 260 265 270	816
tat ccg atc tac tgg caa ctc ctc tac gcc ttc gaa tcc tcc agc ggc Tyr Pro Ile Tyr Trp Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Glu Ser Ser Ser Gly 275 280 285	864
agc atc agc aat ctc tac aac atg atc aaa tcc gtc gca agc gac tgc Ser Ile Ser Asn Leu Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys 290 295 300	912
tcc gat ccg aca cta ctc ggc aac ttc atc gaa aac cac gac aat ccc	960

ES 2 383 366 T3

Ser	Asp	Pro	Thr	Leu	Leu	Gly	Asn	Phe	Ile	Glu	Asn	His	Asp	Asn	Pro		
305					310					315					320		
cgt	ttc	gcc	tcc	tac	acc	tcc	gac	tac	tcg	caa	gcc	aaa	aac	gtc	ctc	1008	
Arg	Phe	Ala	Ser	Tyr	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Gln	Ala	Lys	Asn	Val	Leu		
				325					330					335			
agc	tac	atc	ttc	ctc	tcc	gac	ggc	atc	ccc	atc	gtc	tac	gcc	ggc	gaa	1056	
Ser	Tyr	Ile	Phe	Leu	Ser	Asp	Gly	Ile	Pro	Ile	Val	Tyr	Ala	Gly	Glu		
			340					345					350				
gaa	cag	cac	tac	tcc	ggc	ggc	aag	gtg	ccc	tac	aac	cgc	gaa	gcg	acc	1104	
Glu	Gln	His	Tyr	Ser	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Tyr	Asn	Arg	Glu	Ala	Thr		
		355					360					365					
tgg	ctt	tca	ggc	tac	gac	acc	tcc	gca	gag	ctg	tac	acc	tgg	ata	gcc	1152	
Trp	Leu	Ser	Gly	Tyr	Asp	Thr	Ser	Ala	Glu	Leu	Tyr	Thr	Trp	Ile	Ala		
	370					375					380						
acc	acg	aac	gcg	atc	cgc	aaa	cta	gcc	atc	tca	gct	gac	tcg	gcc	tac	1200	
Thr	Thr	Asn	Ala	Ile	Arg	Lys	Leu	Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Ser	Ala	Tyr		
385					390					395					400		
att	acc	tac	gcg	aat	gat	gca	ttc	tac	act	gac	agc	aac	acc	atc	gca	1248	
Ile	Thr	Tyr	Ala	Asn	Asp	Ala	Phe	Tyr	Thr	Asp	Ser	Asn	Thr	Ile	Ala		
				405					410					415			
atg	cgc	aaa	ggc	acc	tca	ggg	agc	caa	gtc	atc	acc	gtc	ctc	tcc	aac	1296	
Met	Arg	Lys	Gly	Thr	Ser	Gly	Ser	Gln	Val	Ile	Thr	Val	Leu	Ser	Asn		
			420					425					430				
aaa	ggc	tcc	tca	gga	agc	agc	tac	acc	ctg	acc	ctc	agc	gga	agc	ggc	1344	
Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Gly	Ser	Gly		
		435					440					445					
tac	aca	tcc	ggc	acg	aag	ctg	atc	gaa	gcg	tac	aca	tgc	aca	tcc	gtg	1392	
Tyr	Thr	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Ile	Glu	Ala	Tyr	Thr	Cys	Thr	Ser	Val		
	450					455					460						
acc	gtg	gac	tcg	agc	ggc	gat	att	ccc	gtg	ccg	atg	gcg	tcg	gga	tta	1440	
Thr	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Asp	Ile	Pro	Val	Pro	Met	Ala	Ser	Gly	Leu		
465					470				475						480		
ccg	aga	gtt	ctt	ctg	ccc	gcg	tcc	gtc	gtc	gat	agc	tct	tcg	ctc	tgt	1488	
Pro	Arg	Val	Leu	Leu	Pro	Ala	Ser	Val	Val	Asp	Ser	Ser	Ser	Leu	Cys		
			485					490						495			
ggc	ggg	agc	gga	aga	aca	acc	acg	acc	aca	act	gct	gct	act	agt		1533	
Gly	Gly	Ser	Gly	Arg	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser			
			500					505					510				

<210> 8
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> Aspergillus niger

 <400> 8

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

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

Gly Gly Ser Gly Arg Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser
500 505 510

<210> 9
<211> 102
<212> PRT
<213> Bacillus flavothermus

<400> 9

Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr
1 5 10 15

Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser Gln Leu Gly
20 25 30

Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro
35 40 45

Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn Ile Gln Phe
50 55 60

Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asp Ile
65 70 75 80

Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly Ala Tyr Thr
85 90 95

Ala Ser Trp Asn Val Pro
100

<210> 10
<211> 99
<212> PRT
<213> Bacillus sp.

<400> 10

Thr Ser Asn Val Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr Val Tyr Gly
1 5 10 15

Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Pro Glu Leu Gly Asn Trp Asn
20 25 30

Ile Ala Asn Ala Ile Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Trp Lys
35 40 45

Thr Thr Val Ser Leu Pro Gln Gly Lys Ala Ile Glu Phe Lys Phe Ile
50 55 60

ES 2 383 366 T3

Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asn Ile Ala Asn Arg
65 70 75 80

Thr Tyr Thr Val Pro Phe Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Thr Ala Asn Trp
85 90 95

Asn Val Pro

<210> 11
<211> 102
<212> PRT
<213> Alcaliphilic Bacillus

<400> 11

Thr Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr
1 5 10 15

Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser Gln Leu Gly
20 25 30

Asn Trp Asp Pro Val Asn Ala Val Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro
35 40 45

Thr Trp Val Val Thr Val Pro Leu Pro Gln Ser Gln Asn Ile Gln Phe
50 55 60

Lys Phe Ile Lys Lys Asp Gly Ser Gly Asn Val Ile Trp Glu Asn Ile
65 70 75 80

Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly Ala Tyr Thr
85 90 95

Ala Asn Trp Asn Val Pro
100

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> Hormoconis resinae

<400> 12

Cys Gln Val Ser Ile Thr Phe Asn Ile Asn Ala Thr Thr Tyr Tyr Gly
1 5 10 15

Glu Asn Leu Tyr Val Ile Gly Asn Ser Ser Asp Leu Gly Ala Trp Asn
20 25 30

ES 2 383 366 T3

Ile Ala Asp Ala Tyr Pro Leu Ser Ala Ser Ala Tyr Thr Gln Asp Arg
35 40 45

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

Tyr Gln Tyr Val Arg Gln Glu Asp Cys Asp Gln Pro Tyr Ile Tyr Glu
65 70 75 80

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

Thr Thr Asp Asp Ala Trp Met Gly Pro Val Gly Ser Ser Gly Asn Cys
100 105 110

<210> 13
<211> 95
<212> PRT
<213> Lentinula edodes

<400> 13

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

Val Tyr Leu Thr Gly Ala Val Asp Ala Leu Glu Asp Trp Ser Thr Asp
20 25 30

Asn Ala Ile Leu Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Val Thr
35 40 45

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

Asp Gly Ser Gly Thr Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Met Glu Ile
65 70 75 80

Thr Thr Pro Ala Asn Gly Thr Tyr Ala Thr Asn Asp Thr Trp Arg
85 90 95

<210> 14
<211> 107
<212> PRT
<213> Neurospora crassa

<400> 14

ES 2 383 366 T3

Cys Ala Ala Asp His Glu Val Leu Val Thr Phe Asn Glu Lys Val Thr

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

<210> 15
<211> 115
<212> PRT
<213> Talaromyces byssochlamydioides

<400> 15

ES 2 383 366 T3

Thr Thr Thr Gly Ala Ala Pro Cys Thr Thr Pro Thr Thr Val Ala Val
1 5 10 15

Thr Phe Asp Glu Ile Val Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Thr Val Tyr Leu
20 25 30

Ser Gly Ser Ile Pro Ala Leu Gly Asn Trp Asp Thr Ser Ser Ala Ile
35 40 45

Ala Leu Ser Ala Val Asp Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val
50 55 60

Thr Val Asn Leu Pro Ala Gly Thr Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Val
65 70 75 80

Gln Gln Thr Asp Gly Thr Ile Val Trp Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser
85 90 95

Tyr Thr Val Pro Ala Asn Cys Gly Gln Thr Thr Ala Ile Ile Asp Asp
100 105 110

Ser Trp Gln
115

<210> 16
<211> 115
<212> PRT
<213> Geosmithia cylindrospora:

<400> 16

ES 2 383 366 T3

Thr Ser Thr Gly Ser Ala Pro Cys Thr Thr Pro Thr Thr Val Ala Val
1 5 10 15

Thr Phe Asp Glu Ile Val Thr Thr Ser Tyr Gly Glu Thr Val Tyr Leu
20 25 30

Ala Gly Ser Ile Ala Ala Leu Gly Asn Trp Asp Thr Asn Ser Ala Ile
35 40 45

Ala Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Thr Ser Asn Asn Asn Leu Trp Tyr Val
50 55 60

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

Lys Glu Thr Asp Ser Thr Ile Val Trp Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser
85 90 95

Tyr Thr Val Pro Ala Asn Cys Gly Gln Thr Thr Ala Ile Ile Asp Asp
100 105 110

Thr Trp Gln
115

<210> 17
<211> 139
<212> PRT
<213> Scorias spongiosa

<400> 17

Ala Lys Val Pro Ser Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Gly Thr Cys
1 5 10 15

Thr Thr Ala Thr Ser Thr Phe Gly Gly Ser Thr Pro Thr Thr Ser Cys
20 25 30

Ala Thr Thr Pro Thr Leu Thr Thr Val Leu Phe Asn Glu Arg Ala Thr
35 40 45

ES 2 383 366 T3

Thr Asn Phe Gly Gln Asn Val His Leu Thr Gly Ser Ile Ser Gln Leu
50 55 60

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

Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Phe Val Arg Val Gln Leu Pro Ala Gly
85 90 95

Thr Ser Phe Gln Tyr Lys Tyr Phe Lys Lys Asp Ser Ser Asn Ala Val
100 105 110

Ala Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Leu Asn Cys
115 120 125

Ala Gly Thr Ala Thr Glu Asn Asp Thr Trp Arg
130 135

<210> 18

<211> 126

<212> PRT

<213> Eupenicillium ludwigii

<400> 18

Ser Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Lys Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr
1 5 10 15

Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Ile
20 25 30

Ala Thr Thr Tyr Tyr Gly Glu Asn Ile Lys Ile Ala Gly Ser Ile Ser
35 40 45

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

Asp Tyr Thr Ser Ser Asp His Leu Trp Phe Val Asp Ile Asp Leu Pro
65 70 75 80

Ala Gly Thr Val Phe Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Ile Glu Ser Asp Gly
85 90 95

Ser Ile Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala
100 105 110

Ala Cys Ala Thr Thr Ala Val Thr Glu Asn Asp Thr Trp Arg
115 120 125

<210> 19

ES 2 383 366 T3

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Aspergillus japonicus

5 <400> 19

```

Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ser Ser Cys Ser Thr Pro Thr Ser Val Ala
1          5          10          15

Val Thr Phe Asp Val Ile Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Val Tyr
          20          25          30

Ile Ser Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Ser Trp Asp Thr Ser Ser Ala
          35          40          45

Ile Ala Leu Ser Ala Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Asn Asn Leu Trp Tyr
          50          55          60

Ala Thr Val His Leu Pro Ala Gly Thr Thr Phe Gln Tyr Lys Tyr Ile
65          70          75          80

Arg Lys Glu Thr Asp Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg
          85          90          95

Ser Tyr Thr Val Pro Ser Ser Cys Gly Val Ser Ser Ala Thr Glu Ser
          100          105          110

Asp Thr Trp Arg
          115
  
```

10

<210> 20
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Penicillium cf. miczynskii

15

<400> 20

```

Thr Thr Thr Gly Gly Thr Thr Thr Ser Gln Gly Ser Thr Thr Thr Thr
1          5          10          15

Ser Lys Thr Ser Thr Thr Thr Ser Ser Cys Thr Ala Pro Thr Ser Val
          20          25          30

Ala Val Thr Phe Asp Leu Ile Ala Thr Thr Val Tyr Asp Glu Asn Val
          35          40          45
  
```

ES 2 383 366 T3

Gln Leu Ala Gly Ser Ile Ser Ala Leu Gly Ser Trp Asp Thr Ser Ser
50 55 60

Ala Ile Arg Leu Ser Ala Ser Gln Tyr Thr Ser Ser Asn His Leu Trp
65 70 75 80

Tyr Val Ala Val Ser Leu Pro Ala Gly Gln Val Phe Gln Tyr Lys Tyr
85 90 95

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

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

Ser Asp Thr Trp Arg
130

<210> 21
<211> 116
<212> PRT
<213> Mz1 Penicillium sp.

<400> 21

Thr Lys Thr Ser Thr Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala
1 5 10 15

Val Thr Phe Asp Leu Ile Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Lys
20 25 30

Ile Ala Gly Ser Ile Ala Ala Leu Gly Ala Trp Asp Thr Asp Asp Ala
35 40 45

Val Ala Leu Ser Ala Ala Asp Tyr Thr Asp Ser Asp His Leu Trp Phe
50 55 60

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

Arg Val Glu Ser Asp Gly Thr Ile Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg
85 90 95

Ser Tyr Thr Val Pro Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Val Thr Glu Ser
100 105 110

Asp Thr Trp Arg
115

ES 2 383 366 T3

<210> 22
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Thysanophora sp

<400> 22

Phe Thr Ser Thr Thr Lys Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ser Val Ala
 1 5 10 15

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

Leu Val Gly Ser Ile Ser Glu Leu Gly Asp Trp Asp Thr Gly Ser Ala
 35 40 45

Ile Ala Leu His Ala Thr Asp Tyr Thr Asp Ser Asp His Leu Trp Phe
 50 55 60

Val Thr Val Gly Leu Pro Ala Gly Ala Ser Phe Glu Tyr Lys Tyr Ile
 65 70 75 80

Arg Val Glu Ser Ser Gly Thr Ile Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg
 85 90 95

Ser Tyr Thr Val Pro Ala Ala Cys Ala Thr Thr Ala Val Thr Glu Ser
 100 105 110

Asp Thr

<210> 23
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Humicola grisea var. thermoidea

<400> 23

Ala Asp Ala Ser Glu Val Tyr Val Thr Phe Asn Glu Arg Val Ser Thr
 1 5 10 15

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

Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala Val Thr Leu Ser Ala Ser Gly Tyr Lys
 35 40 45

ES 2 383 366 T3

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

Ser Ala Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Lys Val Gly Thr Asn Gly Lys Ile
65 70 75 80

Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Ile Thr Leu Gln Thr Ala Ser
85 90 95

Ser Ala Gly Lys Cys Ala Ala Gln Thr Val Asn Asp Ser Trp Arg
100 105 110

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

<400> 24

Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr
1 5 10 15

Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu
20 25 30

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

Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly
50 55 60

Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val
65 70 75 80

Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys
85 90 95

Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
100 105

<210> 25
<211> 97
<212> PRT
<213> Aspergillus rolfsii

<400> 25

Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln Asn
1 5 10 15

ES 2 383 366 T3

Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro Ala
20 25 30

Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala Thr
35 40 45

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

Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu Ile
65 70 75 80

Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp Glu
85 90 95

Ser

<210> 26
<211> 38
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

<400> 26

Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val
1 5 10 15

Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser
20 25 30

Thr Ser Ser Thr Ser Ala
35

<210> 27
<211> 31
<212> PRT
<213> Aspergillus kawachii

<400> 27

Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser Thr Ser Lys Ala Thr
1 5 10 15

Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Ser Ser Ser
20 25 30

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> Athelia rolfsii

<400> 28

ES 2 383 366 T3

Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly Ser
 1 5 10

5 <210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Artificial
 <400> 29

15 Pro Glu Pro Thr Pro Glu Pro Thr
 1 5

20 <210> 30
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> Aspergillus oryzae
 <400> 30

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

Pro Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser Ile Tyr
 20 25 30

Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Thr Ala
 35 40 45

Thr Cys Asn Thr Ala Asp Gln Lys Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln Gly
 50 55 60

Ile Ile Asp Lys Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile
 65 70 75 80

Trp Ile Thr Pro Val Thr Ala Gln Leu Pro Gln Thr Thr Ala Tyr Gly
 85 90 95

Asp Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Asp Ile Tyr Ser Leu Asn Glu
 100 105 110

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

ES 2 383 366 T3

Glu Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met Gly
 130 135 140

Tyr Asp Gly Ala Gly Ser Ser Val Asp Tyr Ser Val Phe Lys Pro Phe
 145 150 155 160

Ser Ser Gln Asp Tyr Phe His Pro Phe Cys Phe Ile Gln Asn Tyr Glu
 165 170 175

Asp Gln Thr Gln Val Glu Asp Cys Trp Leu Gly Asp Asn Thr Val Ser
 180 185 190

Leu Pro Asp Leu Asp Thr Thr Lys Asp Val Val Lys Asn Glu Trp Tyr
 195 200 205

Asp Trp Val Gly Ser Leu Val Ser Asn Tyr Ser Ile Asp Gly Leu Arg
 210 215 220

Ile Asp Thr Val Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr Asn
 225 230 235 240

Lys Ala Ala Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Leu Asp Gly Asp Pro
 245 250 255

Ala Tyr Thr Cys Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn Tyr
 260 265 270

Pro Ile Tyr Tyr Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly Ser
 275 280 285

Met Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys Pro
 290 295 300

Asp Ser Thr Leu Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro Arg
 305 310 315 320

Phe Ala Ser Tyr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala Ala
 325 330 335

Phe Ile Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln Glu
 340 345 350

Gln His Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr Trp
 355 360 365

ES 2 383 366 T3

Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala Ser
370 375 380

Ala Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe Val
385 390 395 400

Thr Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Ala Met
405 410 415

Arg Lys Gly Thr Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn Lys
420 425 430

Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly Tyr
435 440 445

Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val Thr
450 455 460

Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu Pro
465 470 475 480

Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser
485 490 495

Ser Ser

<210> 31
<211> 1923
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1923)

<400> 31

atg aga tta tcg act tcg agt ctc ttc ctt tcc gtg tct ctg ctg ggg	48
Met Arg Leu Ser Thr Ser Ser Leu Phe Leu Ser Val Ser Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
aag ctg gcc ctc ggg ctg tcg gct gca gaa tgg cgc act cag tcg att	96
Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile	
20 25 30	
tac ttc cta ttg acg gat cgg ttc ggt agg acg gac aat tcg acg aca	144
Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr	
35 40 45	

ES 2 383 366 T3

gct aca tgc gat acg ggt gac caa atc tat tgt ggt ggc agt tgg caa Ala Thr Cys Asp Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln 50 55 60	192
gga atc atc aac cat ctg gat tat atc cag ggc atg gga ttc acg gcc Gly Ile Ile Asn His Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala 65 70 75 80	240
atc tgg atc tcg cct atc act gaa cag ctg ccc cag gat act gct gat Ile Trp Ile Ser Pro Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp 85 90 95	288
ggt gaa gct tac cat gga tat tgg cag cag aag ata tac gac gtg aac Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn 100 105 110	336
tcc aac ttc ggc act gca gat gac ctc aag tcc ctc tca gat gcg ctt Ser Asn Phe Gly Thr Ala Asp Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu 115 120 125	384
cat gcc cgc gga atg tac ctc atg gtg gac gtc gtc cct aac cac atg His Ala Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asn His Met 130 135 140	432
ggc tac gcc ggc aac ggc aac gat gta gac tac agc gtc ttc gac ccc Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro 145 150 155 160	480
ttc gat tcc tcc tcc tac ttc cac cca tac tgc ctg atc aca gat tgg Phe Asp Ser Ser Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp 165 170 175	528
gac aac ttg acc atg gtc caa gat tgt tgg gag ggt gac acc atc gta Asp Asn Leu Thr Met Val Gln Asp Cys Trp Glu Gly Asp Thr Ile Val 180 185 190	576
tct ctg cca gac cta aac acc acc gaa act gcc gtg aga aca atc tgg Ser Leu Pro Asp Leu Asn Thr Thr Glu Thr Ala Val Arg Thr Ile Trp 195 200 205	624
tat gac tgg gta gcc gac ctg gta tcc aat tat tca gtc gac gga ctc Tyr Asp Trp Val Ala Asp Leu Val Ser Asn Tyr Ser Val Asp Gly Leu 210 215 220	672
cgc atc gac agt gtc ctc gaa gtc gaa cca gac ttc ttc ccg ggc tac Arg Ile Asp Ser Val Leu Glu Val Glu Pro Asp Phe Phe Pro Gly Tyr 225 230 235 240	720
cag gaa gca gca ggt gtc tac tgc gtc ggc gaa gtc gac aac ggc aac Gln Glu Ala Ala Gly Val Tyr Cys Val Gly Glu Val Asp Asn Gly Asn 245 250 255	768
cct gcc ctc gac tgc cca tac cag aag gtc ctg gac ggc gtc ctc aac Pro Ala Leu Asp Cys Pro Tyr Gln Lys Val Leu Asp Gly Val Leu Asn 260 265 270	816
tat ccg atc tac tgg caa ctc ctc tac gcc ttc gaa tcc tcc agc ggc Tyr Pro Ile Tyr Trp Gln Leu Tyr Ala Phe Glu Ser Ser Ser Gly 275 280 285	864

ES 2 383 366 T3

agc atc agc aat ctc tac aac atg atc aaa tcc gtc gca agc gac tgc Ser Ile Ser Asn Leu Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys 290 295 300	912
tcc gat ccg aca cta ctc ggc aac ttc atc gaa aac cac gac aat ccc Ser Asp Pro Thr Leu Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro 305 310 315 320	960
cgt ttc gcc tcc tac acc tcc gac tac tcg caa gcc aaa aac gtc ctc Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu 325 330 335	1008
agc tac atc ttc ctc tcc gac ggc atc ccc atc gtc tac gcc ggc gaa Ser Tyr Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu 340 345 350	1056
gaa cag cac tac tcc ggc ggc aag gtg ccc tac aac cgc gaa gcg acc Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr 355 360 365	1104
tgg ctt tca ggc tac gac acc tcc gca gag ctg tac acc tgg ata gcc Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala 370 375 380	1152
acc acg aac gcg atc cgc aaa cta gcc atc tca gct gac tcg gcc tac Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ala Tyr 385 390 395 400	1200
att acc tac gcg aat gat gca ttc tac act gac agc aac acc atc gca Ile Thr Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala 405 410 415	1248
atg cgc aaa ggc acc tca ggg agc caa gtc atc acc gtc ctc tcc aac Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn 420 425 430	1296
aaa ggc tcc tca gga agc agc tac acc ctg acc ctc agc gga agc ggc Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly 435 440 445	1344
tac aca tcc ggc acg aag ctg atc gaa gcg tac aca tgc aca tcc gtg Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val 450 455 460	1392
acc gtg gac tcg agc ggc gat att ccc gtg ccg atg gcg tcg gga tta Thr Val Asp Ser Ser Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu 465 470 475 480	1440
ccg aga gtt ctt ctg ccc gcg tcc gtc gtc gat agc tct tcg ctc tgt Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys 485 490 495	1488
ggc ggg agc gga aga aca acc acg acc aca act gct gct gct act agt Gly Gly Ser Gly Arg Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser 500 505 510	1536
aca tcc aaa gcc acc acc tcc tct tct tct tct tct gct gct gct act Thr Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr 515 520 525	1584
act tct tca tca tgt acc act ccc acc gcc gtg gct gtg act ttc gat	1632

ES 2 383 366 T3

Thr	Ser	Ser	Ser	Cys	Thr	Thr	Pro	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Thr	Phe	Asp		
530						535					540						
ctg	aca	gct	acc	acc	acc	tac	ggc	gag	aac	atc	tac	ctg	gtc	gga	tcg	1680	
Leu	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Tyr	Gly	Glu	Asn	Ile	Tyr	Leu	Val	Gly	Ser		
545					550				555					560			
atc	tct	cag	ctg	ggg	gac	tgg	gaa	acc	agc	gac	ggc	ata	gct	ctg	agt	1728	
Ile	Ser	Gln	Leu	Gly	Asp	Trp	Glu	Thr	Ser	Asp	Gly	Ile	Ala	Leu	Ser		
			565					570					575				
gct	gac	aag	tac	act	tcc	agc	gac	ccg	ctc	tgg	tat	gtc	act	gtg	act	1776	
Ala	Asp	Lys	Tyr	Thr	Ser	Ser	Asp	Pro	Leu	Trp	Tyr	Val	Thr	Val	Thr		
			580					585					590				
ctg	ccg	gct	ggg	gag	tcg	ttt	gag	tac	aag	ttt	atc	cgc	att	gag	agc	1824	
Leu	Pro	Ala	Gly	Glu	Ser	Phe	Glu	Tyr	Lys	Phe	Ile	Arg	Ile	Glu	Ser		
	595						600					605					
gat	gac	tcc	gtg	gag	tgg	gag	agt	gat	ccc	aac	cga	gaa	tac	acc	gtt	1872	
Asp	Asp	Ser	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asp	Pro	Asn	Arg	Glu	Tyr	Thr	Val		
	610					615					620						
cct	cag	gcg	tgc	gga	acg	tcg	acc	gcg	acg	gtg	act	gac	acc	tgg	cgg	1920	
Pro	Gln	Ala	Cys	Gly	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Asp	Thr	Trp	Arg		
625					630					635					640		
tag																1923	

<210> 32
<211> 640

<212> PRT <213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 32

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

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

Ser Tyr Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu
340 345 350

Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr
355 360 365

Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala
370 375 380

Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ala Tyr
385 390 395 400

Ile Thr Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala
405 410 415

Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn
420 425 430

Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly
435 440 445

Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val
450 455 460

Thr Val Asp Ser Ser Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu
465 470 475 480

Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys
485 490 495

Gly Gly Ser Gly Arg Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser
500 505 510

Thr Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr
515 520 525

Thr Ser Ser Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp
530 535 540

Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser
545 550 555 560

Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser
565 570 575

ES 2 383 366 T3

Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr
580 585 590

Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser
595 600 605

Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val
610 615 620

Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
625 630 635 640

<210> 33
<211> 1890
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1890)

<400> 33

atg aga tta tcg act tcg agt ctc ttc ctt tcc gtg tct ctg ctg ggg	48
Met Arg Leu Ser Thr Ser Ser Leu Phe Leu Ser Val Ser Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
aag ctg gcc ctc ggg ctg tcg gct gca gaa tgg cgc act cag tcg att	96
Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile	
20 25 30	
tac ttc cta ttg acg gat cgg ttc ggt agg acg gac aat tcg acg aca	144
Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr	
35 40 45	
gct aca tgc gat acg ggt gac caa atc tat tgt ggt ggc agt tgg caa	192
Ala Thr Cys Asp Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln	
50 55 60	
gga atc atc aac cat ctg gat tat atc cag ggc atg gga ttc acg gcc	240
Gly Ile Ile Asn His Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala	
65 70 75 80	
atc tgg atc tcg cct atc act gaa cag ctg ccc cag gat act gct gat	288
Ile Trp Ile Ser Pro Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp	
85 90 95	
ggt gaa gct tac cat gga tat tgg cag cag aag ata tac gac gtg aac	336
Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn	
100 105 110	
tcc aac ttc ggc act gca gat gac ctc aag tcc ctc tca gat gcg ctt	384
Ser Asn Phe Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu	

ES 2 383 366 T3

115	120	125	
cat gcc cgc gga atg tac ctc atg gtg gac gtc gtc cct aac cac atg			432
His Ala Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asn His Met			
130	135	140	
ggc tac gcc ggc aac ggc aac gat gta gac tac agc gtc ttc gac ccc			480
Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro			
145	150	155	160
ttc gat tcc tcc tcc tac ttc cac cca tac tgc ctg atc aca gat tgg			528
Phe Asp Ser Ser Ser Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp			
	165	170	175
gac aac ttg acc atg gtc caa gat tgt tgg gag ggt gac acc atc gta			576
Asp Asn Leu Thr Met Val Gln Asp Cys Trp Glu Gly Asp Thr Ile Val			
	180	185	190
tct ctg cca gac cta aac acc acc gaa act gcc gtg aga aca atc tgg			624
Ser Leu Pro Asp Leu Asn Thr Thr Glu Thr Ala Val Arg Thr Ile Trp			
	195	200	205
tat gac tgg gta gcc gac ctg gta tcc aat tat tca gtc gac gga ctc			672
Tyr Asp Trp Val Ala Asp Leu Val Ser Asn Tyr Ser Val Asp Gly Leu			
210	215	220	
cgc atc gac agt gtc ctc gaa gtc gaa cca gac ttc ttc ccg ggc tac			720
Arg Ile Asp Ser Val Leu Glu Val Glu Pro Asp Phe Phe Pro Gly Tyr			
225	230	235	240
cag gaa gca gca ggt gtc tac tgc gtc ggc gaa gtc gac aac ggc aac			768
Gln Glu Ala Ala Gly Val Tyr Cys Val Gly Glu Val Asp Asn Gly Asn			
	245	250	255
cct gcc ctc gac tgc cca tac cag aag gtc ctg gac ggc gtc ctc aac			816
Pro Ala Leu Asp Cys Pro Tyr Gln Lys Val Leu Asp Gly Val Leu Asn			
	260	265	270
tat ccg atc tac tgg caa ctc ctc tac gcc ttc gaa tcc tcc agc ggc			864
Tyr Pro Ile Tyr Trp Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Glu Ser Ser Ser Gly			
	275	280	285
agc atc agc aat ctc tac aac atg atc aaa tcc gtc gca agc gac tgc			912
Ser Ile Ser Asn Leu Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys			
290	295	300	
tcc gat ccg aca cta ctc ggc aac ttc atc gaa aac cac gac aat ccc			960
Ser Asp Pro Thr Leu Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro			
305	310	315	320
cgt ttc gcc tcc tac acc tcc gac tac tcg caa gcc aaa aac gtc ctc			1008
Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu			
	325	330	335
agc tac atc ttc ctc tcc gac ggc atc ccc atc gtc tac gcc ggc gaa			1056
Ser Tyr Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu			
	340	345	350
gaa cag cac tac tcc ggc ggc aag gtg ccc tac aac cgc gaa gcg acc			1104
Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr			
	355	360	365

ES 2 383 366 T3

tgg ctt tca ggc tac gac acc tcc gca gag ctg tac acc tgg ata gcc Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala 370 375 380	1152
acc acg aac gcg atc cgc aaa cta gcc atc tca gct gac tcg gcc tac Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ala Tyr 385 390 395 400	1200
att acc tac gcg aat gat gca ttc tac act gac agc aac acc atc gca Ile Thr Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala 405 410 415	1248
atg cgc aaa ggc acc tca ggg agc caa gtc atc acc gtc ctc tcc aac Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn 420 425 430	1296
aaa ggc tcc tca gga agc agc tac acc ctg acc ctc agc gga agc ggc Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly 435 440 445	1344
tac aca tcc ggc acg aag ctg atc gaa gcg tac aca tgc aca tcc gtg Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val 450 455 460	1392
acc gtg gac tcg agc ggc gat att ccc gtg ccg atg gcg tcg gga tta Thr Val Asp Ser Ser Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu 465 470 475 480	1440
ccg aga gtt ctt ctg ccc gcg tcc gtc gtc gat agc tct tcg ctc tgt Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys 485 490 495	1488
ggc ggg agc gga aga aca acc acg acc aca act gct gct gct act agt Gly Gly Ser Gly Arg Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser 500 505 510	1536
aca tcc aaa gcc acc acc tcc tct tct tct tct gct gct gct act Thr Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr 515 520 525	1584
act tct tca tca gtc gag gtc act ttc gac gtt tac gct acc aca gta Thr Ser Ser Ser Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val 530 535 540	1632
tat ggc cag aac atc tat atc acc ggt gat gtg agt gag ctc ggc aac Tyr Gly Gln Asn Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn 545 550 555 560	1680
tgg aca ccc gcc aat ggt gtt gca ctc tct tct gct aac tac ccc acc Trp Thr Pro Ala Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr 565 570 575	1728
tgg agt gcc acg atc gct ctc ccc gct gac acg aca atc cag tac aag Trp Ser Ala Thr Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys 580 585 590	1776
tat gtc aac att gac ggc agc acc gtc atc tgg gag gat gct atc agc Tyr Val Asn Ile Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser 595 600 605	1824

ES 2 383 366 T3

aat cgc gag atc acg acg ccc gcc agc ggc aca tac acc gaa aaa gac 1872
Asn Arg Glu Ile Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp
610 615 620

act tgg gat gaa tct tag 1890
Thr Trp Asp Glu Ser
625

<210> 34
<211> 629
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<400> 34

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

Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile
20 25 30

Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr
35 40 45

Ala Thr Cys Asp Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln
50 55 60

Gly Ile Ile Asn His Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala
65 70 75 80

Ile Trp Ile Ser Pro Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp
85 90 95

Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn
100 105 110

Ser Asn Phe Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu
115 120 125

His Ala Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asn His Met
130 135 140

Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro
145 150 155 160

Phe Asp Ser Ser Ser Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp
165 170 175

ES 2 383 366 T3

Asp Asn Leu Thr Met Val Gln Asp Cys Trp Glu Gly Asp Thr Ile Val
 180 185 190

Ser Leu Pro Asp Leu Asn Thr Thr Glu Thr Ala Val Arg Thr Ile Trp
 195 200 205

Tyr Asp Trp Val Ala Asp Leu Val Ser Asn Tyr Ser Val Asp Gly Leu
 210 215 220

Arg Ile Asp Ser Val Leu Glu Val Glu Pro Asp Phe Phe Pro Gly Tyr
 225 230 235 240

Gln Glu Ala Ala Gly Val Tyr Cys Val Gly Glu Val Asp Asn Gly Asn
 245 250 255

Pro Ala Leu Asp Cys Pro Tyr Gln Lys Val Leu Asp Gly Val Leu Asn
 260 265 270

Tyr Pro Ile Tyr Trp Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Glu Ser Ser Ser Gly
 275 280 285

Ser Ile Ser Asn Leu Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys
 290 295 300

Ser Asp Pro Thr Leu Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro
 305 310 315 320

Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu
 325 330 335

Ser Tyr Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu
 340 345 350

Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr
 355 360 365

Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala
 370 375 380

Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ala Tyr
 385 390 395 400

Ile Thr Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala
 405 410 415

ES 2 383 366 T3

Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn
420 425 430

Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly
435 440 445

Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val
450 455 460

Thr Val Asp Ser Ser Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu
465 470 475 480

Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys
485 490 495

Gly Gly Ser Gly Arg Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser
500 505 510

Thr Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr
515 520 525

Thr Ser Ser Ser Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val
530 535 540

Tyr Gly Gln Asn Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn
545 550 555 560

Trp Thr Pro Ala Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr
565 570 575

Trp Ser Ala Thr Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys
580 585 590

Tyr Val Asn Ile Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser
595 600 605

Asn Arg Glu Ile Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp
610 615 620

Thr Trp Asp Glu Ser
625

<210> 35
<211> 1923
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

5

<223> Artificial

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1923)

<400> 35

atg gtc gcg tgg tgg tct cta ttt ctg tac ggc ctt cag gtc gcg gca	48
Met Val Ala Trp Trp Ser Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Gln Val Ala Ala	
1 5 10 15	
cct gct ttg gct gca acg cct gcg gac tgg cga tcg caa tcc att tat	96
Pro Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser Ile Tyr	
20 25 30	
ttc ctt ctc acg gat cga ttt gca agg acg gat ggg tcg acg act gcg	144
Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Thr Ala	
35 40 45	
act tgt aat act gcg gat cag aaa tac tgt ggt gga aca tgg cag ggc	192
Thr Cys Asn Thr Ala Asp Gln Lys Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln Gly	
50 55 60	
atc atc gac aag ttg gac tat atc cag gga atg ggc ttc aca gcc atc	240
Ile Ile Asp Lys Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
tgg atc acc ccc gtt aca gcc cag ctg ccc cag acc acc gca tat gga	288
Trp Ile Thr Pro Val Thr Ala Gln Leu Pro Gln Thr Thr Ala Tyr Gly	
85 90 95	
gat gcc tac cat ggc tac tgg cag cag gat ata tac tct ctg aac gaa	336
Asp Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Asp Ile Tyr Ser Leu Asn Glu	
100 105 110	
aac tac ggc act gca gat gac ttg aag gcg ctc tct tcg gcc ctt cat	384
Asn Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Ala Leu His	
115 120 125	
gag agg ggg atg tat ctt atg gtc gat gtg gtt gct aac cat atg ggc	432
Glu Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met Gly	
130 135 140	
tat gat gga gcg ggt agc tca gtc gat tac agt gtg ttt aaa ccg ttc	480
Tyr Asp Gly Ala Gly Ser Ser Val Asp Tyr Ser Val Phe Lys Pro Phe	
145 150 155 160	
agt tcc caa gac tac ttc cac ccg ttc tgt ttc att caa aac tat gaa	528
Ser Ser Gln Asp Tyr Phe His Pro Phe Cys Phe Ile Gln Asn Tyr Glu	
165 170 175	
gat cag act cag gtt gag gat tgc tgg cta gga gat aac act gtc tcc	576
Asp Gln Thr Gln Val Glu Asp Cys Trp Leu Gly Asp Asn Thr Val Ser	
180 185 190	
ttg cct gat ctc gat acc acc aag gat gtg gtc aag aat gaa tgg tac	624
Leu Pro Asp Leu Asp Thr Thr Lys Asp Val Val Lys Asn Glu Trp Tyr	
195 200 205	

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

aca gcc ggc cag caa ttg acg gag gtc att ggc tgc acg acc gtg acg	1392
Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val Thr	
450 455 460	
ggt ggt tcg gat gga aat gtg cct gtt cct atg gca ggt ggg cta cct	1440
Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu Pro	
465 470 475 480	
agg gta ttg tat ccg act gag aag ttg gca ggt agc aag atc tgt agt	1488
Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser	
485 490 495	
agc tcg gga aga aca acc acg acc aca act gct gct gct act agt aca	1536
Ser Ser Gly Arg Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser Thr	
500 505 510	
tcc aaa gcc acc acc tcc tct tct tct tct tct gct gct gct act act	1584
Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Thr Thr	
515 520 525	
tct tca tca tgc acc gca aca agc acc acc ctc ccc atc acc ttc gaa	1632
Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile Thr Phe Glu	
530 535 540	
gaa ctc gtc acc act acc tac ggg gaa gaa gtc tac ctc agc gga tct	1680
Glu Leu Val Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu Ser Gly Ser	
545 550 555 560	
atc tcc cag ctc gga gag tgg gat acg agt gac gcg gtg aag ttg tcc	1728
Ile Ser Gln Leu Gly Glu Trp Asp Thr Ser Asp Ala Val Lys Leu Ser	
565 570 575	
gcg gat gat tat acc tcg agt aac ccc gag tgg tct gtt act gtg tcg	1776
Ala Asp Asp Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val Thr Val Ser	
580 585 590	
ttg ccg gtg ggg acg acc ttc gag tat aag ttt att aag gtc gat gag	1824
Leu Pro Val Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys Val Asp Glu	
595 600 605	
ggt gga agt gtg act tgg gaa agt gat ccg aat agg gag tat act gtg	1872
Gly Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val	
610 615 620	
cct gaa tgt ggg aat ggg agt ggg gag acg gtg gtt gat acg tgg agg	1920
Pro Glu Cys Gly Asn Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Trp Arg	
625 630 635 640	
tag	1923

<210> 36
 <211> 640
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial

<400> 36

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

Ser Ser Gly Arg Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser Thr
500 505 510

Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
515 520 525

Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile Thr Phe Glu
530 535 540

Glu Leu Val Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu Ser Gly Ser
545 550 555 560

Ile Ser Gln Leu Gly Glu Trp Asp Thr Ser Asp Ala Val Lys Leu Ser
565 570 575

Ala Asp Asp Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val Thr Val Ser
580 585 590

Leu Pro Val Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys Val Asp Glu
595 600 605

Gly Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val
610 615 620

Pro Glu Cys Gly Asn Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Trp Arg
625 630 635 640

<210> 37
<211> 1830
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1830)

<400> 37

atg aga tta tcg act tcg agt ctc ttc ctt tcc gtg tct ctg ctg ggg	48
Met Arg Leu Ser Thr Ser Ser Leu Phe Leu Ser Val Ser Leu Leu Gly	
1 5 10 15	
aag ctg gcc ctc ggg ctg tcg gct gca gaa tgg cgc act cag tcg att	96
Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile	
20 25 30	
tac ttc cta ttg acg gat cgg ttc ggt agg acg gac aat tcg acg aca	144

ES 2 383 366 T3

Tyr	Phe	Leu	Leu	Thr	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Thr	Asp	Asn	Ser	Thr	Thr	
		35					40					45				
gct	aca	tgc	gat	acg	ggt	gac	caa	atc	tat	tgt	ggt	ggc	agt	tgg	caa	192
Ala	Thr	Cys	Asp	Thr	Gly	Asp	Gln	Ile	Tyr	Cys	Gly	Gly	Ser	Trp	Gln	
	50					55					60					
gga	atc	atc	aac	cat	ctg	gat	tat	atc	cag	ggc	atg	gga	ttc	acg	gcc	240
Gly	Ile	Ile	Asn	His	Leu	Asp	Tyr	Ile	Gln	Gly	Met	Gly	Phe	Thr	Ala	
65					70					75					80	
atc	tgg	atc	tcg	cct	atc	act	gaa	cag	ctg	ccc	cag	gat	act	gct	gat	288
Ile	Trp	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Glu	Gln	Leu	Pro	Gln	Asp	Thr	Ala	Asp	
				85					90					95		
ggt	gaa	gct	tac	cat	gga	tat	tgg	cag	cag	aag	ata	tac	gac	gtg	aac	336
Gly	Glu	Ala	Tyr	His	Gly	Tyr	Trp	Gln	Gln	Lys	Ile	Tyr	Asp	Val	Asn	
			100					105					110			
tcc	aac	ttc	ggc	act	gca	gat	gac	ctc	aag	tcc	ctc	tca	gat	gcg	ctt	384
Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Ala	Asp	Asp	Leu	Lys	Ser	Leu	Ser	Asp	Ala	Leu	
		115					120					125				
cat	gcc	cgc	gga	atg	tac	ctc	atg	gtg	gac	gtc	gtc	cct	aac	cac	atg	432
His	Ala	Arg	Gly	Met	Tyr	Leu	Met	Val	Asp	Val	Val	Pro	Asn	His	Met	
	130					135					140					
ggc	tac	gcc	ggc	aac	ggc	aac	gat	gta	gac	tac	agc	gtc	ttc	gac	ccc	480
Gly	Tyr	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Asp	Val	Asp	Tyr	Ser	Val	Phe	Asp	Pro	
145					150					155					160	
ttc	gat	tcc	tcc	tcc	tac	ttc	cac	cca	tac	tgc	ctg	atc	aca	gat	tgg	528
Phe	Asp	Ser	Ser	Ser	Tyr	Phe	His	Pro	Tyr	Cys	Leu	Ile	Thr	Asp	Trp	
				165					170					175		
gac	aac	ttg	acc	atg	gtc	caa	gat	tgt	tgg	gag	ggt	gac	acc	atc	gta	576
Asp	Asn	Leu	Thr	Met	Val	Gln	Asp	Cys	Trp	Glu	Gly	Asp	Thr	Ile	Val	
			180					185					190			
tct	ctg	cca	gac	cta	aac	acc	acc	gaa	act	gcc	gtg	aga	aca	atc	tgg	624
Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Asn	Thr	Thr	Glu	Thr	Ala	Val	Arg	Thr	Ile	Trp	
		195					200					205				
tat	gac	tgg	gta	gcc	gac	ctg	gta	tcc	aat	tat	tca	gtc	gac	gga	ctc	672
Tyr	Asp	Trp	Val	Ala	Asp	Leu	Val	Ser	Asn	Tyr	Ser	Val	Asp	Gly	Leu	
	210					215					220					
cgc	atc	gac	agt	gtc	ctc	gaa	gtc	gaa	cca	gac	ttc	ttc	ccg	ggc	tac	720
Arg	Ile	Asp	Ser	Val	Leu	Glu	Val	Glu	Pro	Asp	Phe	Phe	Pro	Gly	Tyr	
225					230					235					240	
cag	gaa	gca	gca	ggt	gtc	tac	tgc	gtc	ggc	gaa	gtc	gac	aac	ggc	aac	768
Gln	Glu	Ala	Ala	Gly	Val	Tyr	Cys	Val	Gly	Glu	Val	Asp	Asn	Gly	Asn	
				245					250					255		
cct	gcc	ctc	gac	tgc	cca	tac	cag	aag	gtc	ctg	gac	ggc	gtc	ctc	aac	816
Pro	Ala	Leu	Asp	Cys	Pro	Tyr	Gln	Lys	Val	Leu	Asp	Gly	Val	Leu	Asn	
			260					265					270			
tat	ccg	atc	tac	tgg	caa	ctc	ctc	tac	gcc	ttc	gaa	tcc	tcc	agc	ggc	864
Tyr	Pro	Ile	Tyr	Trp	Gln	Leu	Leu	Tyr	Ala	Phe	Glu	Ser	Ser	Ser	Gly	

ES 2 383 366 T3

275	280	285	
agc atc agc aat ctc tac aac atg atc aaa tcc gtc gca agc gac tgc Ser Ile Ser Asn Leu Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys 290 295 300			912
tcc gat ccg aca cta ctc ggc aac ttc atc gaa aac cac gac aat ccc Ser Asp Pro Thr Leu Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro 305 310 315 320			960
cgt ttc gcc tcc tac acc tcc gac tac tcg caa gcc aaa aac gtc ctc Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu 325 330 335			1008
agc tac atc ttc ctc tcc gac ggc atc ccc atc gtc tac gcc ggc gaa Ser Tyr Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu 340 345 350			1056
gaa cag cac tac tcc ggc ggc aag gtg ccc tac aac cgc gaa gcg acc Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr 355 360 365			1104
tgg ctt tca ggc tac gac acc tcc gca gag ctg tac acc tgg ata gcc Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala 370 375 380			1152
acc acg aac gcg atc cgc aaa cta gcc atc tca gct gac tcg gcc tac Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ala Tyr 385 390 395 400			1200
att acc tac gcg aat gat gca ttc tac act gac agc aac acc atc gca Ile Thr Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala 405 410 415			1248
atg cgc aaa ggc acc tca ggg agc caa gtc atc acc gtc ctc tcc aac Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn 420 425 430			1296
aaa ggc tcc tca gga agc agc tac acc ctg acc ctc agc gga agc ggc Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly 435 440 445			1344
tac aca tcc ggc acg aag ctg atc gaa gcg tac aca tgc aca tcc gtg Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val 450 455 460			1392
acc gtg gac tcg agc ggc gat att ccc gtg ccg atg gcg tcg gga tta Thr Val Asp Ser Ser Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu 465 470 475 480			1440
ccg aga gtt ctt ctg ccc gcg tcc gtc gtc gat agc tct tcg ctc tgt Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys 485 490 495			1488
ggc ggg agc gga aga ggt gct aca agc ccg ggt ggc tcc tcg ggt agt Gly Gly Ser Gly Arg Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly Ser 500 505 510			1536
gtc gag gtc act ttc gac gtt tac gct acc aca gta tat ggc cag aac Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln Asn 515 520 525			1584

ES 2 383 366 T3

```

atc tat atc acc ggt gat gtg agt gag ctc ggc aac tgg aca ccc gcc      1632
Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro Ala
  530                      535                      540

aat ggt gtt gca ctc tct tct gct aac tac ccc acc tgg agt gcc acg      1680
Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala Thr
  545                      550                      555                      560

atc gct ctc ccc gct gac acg aca atc cag tac aag tat gtc aac att      1728
Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Asn Ile
                      565                      570                      575

gac ggc agc acc gtc atc tgg gag gat gct atc agc aat cgc gag atc      1776
Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu Ile
                      580                      585                      590

acg acg ccc gcc agc ggc aca tac acc gaa aaa gac act tgg gat gaa      1824
Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp Glu
  595                      600                      605

tct tag      1830
Ser

```

<210> 38
 <211> 609
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Artificial

<400> 38

```

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

```

```

Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile
      20                      25                      30

```

```

Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr
      35                      40                      45

```

```

Ala Thr Cys Asp Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln
      50                      55                      60

```

```

Gly Ile Ile Asn His Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala
      65                      70                      75                      80

```

```

Ile Trp Ile Ser Pro Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp
      85                      90                      95

```

```

Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn

```

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr
 355 360 365
 Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala
 370 375 380
 Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ala Tyr
 385 390 395 400
 Ile Thr Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala
 405 410 415
 Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn
 420 425 430
 Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly
 435 440 445
 Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val
 450 455 460
 Thr Val Asp Ser Ser Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu
 465 470 475 480
 Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys
 485 490 495
 Gly Gly Ser Gly Arg Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly Ser
 500 505 510
 Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln Asn
 515 520 525
 Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro Ala
 530 535 540
 Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala Thr
 545 550 555 560
 Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Asn Ile
 565 570 575
 Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu Ile
 580 585 590

ES 2 383 366 T3

Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp Glu
595 600 605

Ser

<210> 39
<211> 1827
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Artificial

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1827)

<400> 39

atg gtc gcg tgg tgg tct cta ttt ctg tac ggc ctt cag gtc gcg gca	48
Met Val Ala Trp Trp Ser Leu Phe Leu Tyr Gly Leu Gln Val Ala Ala	
1 5 10 15	
cct gct ttg gct gca acg cct gcg gac tgg cga tcg caa tcc att tat	96
Pro Ala Leu Ala Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser Ile Tyr	
20 25 30	
ttc ctt ctc acg gat cga ttt gca agg acg gat ggg tcg acg act gcg	144
Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Thr Ala	
35 40 45	
act tgt aat act gcg gat cag aaa tac tgt ggt gga aca tgg cag ggc	192
Thr Cys Asn Thr Ala Asp Gln Lys Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln Gly	
50 55 60	
atc atc gac aag ttg gac tat atc cag gga atg ggc ttc aca gcc atc	240
Ile Ile Asp Lys Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile	
65 70 75 80	
tgg atc acc ccc gtt aca gcc cag ctg ccc cag acc acc gca tat gga	288
Trp Ile Thr Pro Val Thr Ala Gln Leu Pro Gln Thr Thr Ala Tyr Gly	
85 90 95	
gat gcc tac cat ggc tac tgg cag cag gat ata tac tct ctg aac gaa	336
Asp Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Asp Ile Tyr Ser Leu Asn Glu	
100 105 110	
aac tac ggc act gca gat gac ttg aag gcg ctc tct tcg gcc ctt cat	384
Asn Tyr Gly Thr Ala Asp Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Ala Leu His	
115 120 125	
gag agg ggg atg tat ctt atg gtc gat gtg gtt gct aac cat atg ggc	432
Glu Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met Gly	
130 135 140	
tat gat gga gcg ggt agc tca gtc gat tac agt gtg ttt aaa ccg ttc	480
Tyr Asp Gly Ala Gly Ser Ser Val Asp Tyr Ser Val Phe Lys Pro Phe	

ES 2 383 366 T3

145					150					155					160	
agt tcc caa gac tac ttc cac ccg ttc tgt ttc att caa aac tat gaa					ttc cac ccg ttc tgt ttc att caa aac tat gaa											528
Ser Ser Gln Asp Tyr Phe His Pro Phe Cys Phe Ile Gln Asn Tyr Glu					Phe His Pro Phe Cys Phe Ile Gln Asn Tyr Glu											
				165					170						175	
gat cag act cag gtt gag gat tgc tgg cta gga gat aac act gtc tcc					gag gat tgc tgg cta gga gat aac act gtc tcc											576
Asp Gln Thr Gln Val Glu Asp Cys Trp Leu Gly Asp Asn Thr Val Ser					Glu Asp Cys Trp Leu Gly Asp Asn Thr Val Ser											
				180				185						190		
ttg cct gat ctc gat acc acc aag gat gtg gtc aag aat gaa tgg tac					acc acc aag gat gtg gtc aag aat gaa tgg tac											624
Leu Pro Asp Leu Asp Thr Thr Lys Asp Val Val Lys Asn Glu Trp Tyr					Asp Thr Thr Lys Asp Val Val Lys Asn Glu Trp Tyr											
				195				200						205		
gac tgg gtg gga tca ttg gta tgc aac tac tcc att gac ggc ctc cgt					ttg gta tgc aac tac tcc att gac ggc ctc cgt											672
Asp Trp Val Gly Ser Leu Val Ser Asn Tyr Ser Ile Asp Gly Leu Arg					Gly Ser Leu Val Ser Asn Tyr Ser Ile Asp Gly Leu Arg											
				210				215						220		
atc gac aca gta aaa cac gtc cag aag gac ttc tgg ccc ggg tac aac					aca gta aaa cac gtc cag aag gac ttc tgg ccc ggg tac aac											720
Ile Asp Thr Val Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr Asn					Val Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr Asn											
					225			230						235		240
aaa gcc gca ggc gtg tac tgt atc ggc gag gtg ctc gac ggt gat ccg					gtg tac tgt atc ggc gag gtg ctc gac ggt gat ccg											768
Lys Ala Ala Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Leu Asp Gly Asp Pro					Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Leu Asp Gly Asp Pro											
				245				250							255	
gcc tac act tgt ccc tac cag aac gtc atg gac ggc gta ctg aac tat					act tgt ccc tac cag aac gtc atg gac ggc gta ctg aac tat											816
Ala Tyr Thr Cys Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn Tyr					Thr Cys Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn Tyr											
				260				265						270		
ccc att tac tat cca ctc ctc aac gcc ttc aag tca acc tcc ggc agc					ccc att tac tat cca ctc ctc aac gcc ttc aag tca acc tcc ggc agc											864
Pro Ile Tyr Tyr Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly Ser					Tyr Tyr Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly Ser											
				275				280						285		
atg gac gac ctc tac aac atg atc aac acc gtc aaa tcc gac tgt cca					atg gac gac ctc tac aac atg atc aac acc gtc aaa tcc gac tgt cca											912
Met Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys Pro					Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys Pro											
				290				295						300		
gac tca aca ctc ctg ggc aca ttc gtc gag aac cac gac aac cca ccg					gac tca aca ctc ctg ggc aca ttc gtc gag aac cac gac aac cca ccg											960
Asp Ser Thr Leu Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro Arg					Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro Arg											
				305				310						315		320
ttc gct tct tac acc aac gac ata gcc ctc gcc aag aac gtc gca gca					ttc gct tct tac acc aac gac ata gcc ctc gcc aag aac gtc gca gca											1008
Phe Ala Ser Tyr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala Ala					Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala Ala											
				325				330							335	
ttc atc atc ctc aac gac gga atc ccc atc atc tac gcc ggc caa gaa					ttc atc atc ctc aac gac gga atc ccc atc atc tac gcc ggc caa gaa											1056
Phe Ile Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln Glu					Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln Glu											
				340				345						350		
cag cac tac gcc ggc gga aac gac ccc gcg aac cgc gaa gca acc tgg					cag cac tac gcc ggc gga aac gac ccc gcg aac cgc gaa gca acc tgg											1104
Gln His Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr Trp					Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr Trp											
				355				360						365		
ctc tgc ggc tac ccg acc gac agc gag ctg tac aag tta att gcc tcc					ctc tgc ggc tac ccg acc gac agc gag ctg tac aag tta att gcc tcc											1152
Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala Ser					Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala Ser											
				370				375						380		
gcg aac gca atc cgg aac tat gcc att agc aaa gat aca gga ttc gtg					gcg aac gca atc cgg aac tat gcc att agc aaa gat aca gga ttc gtg											1200
Ala Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe Val					Ala Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe Val											
				385				390						395		400

ES 2 383 366 T3

acc tac aag aac tgg ccc atc tac aaa gac gac aca acg atc gcc atg	1248
Thr Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Ala Met	
405 410 415	
cgc aag ggc aca gat ggg tcg cag atc gtg act atc ttg tcc aac aag	1296
Arg Lys Gly Thr Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn Lys	
420 425 430	
ggt gct tcg ggt gat tcg tat acc ctc tcc ttg agt ggt gcg ggt tac	1344
Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly Tyr	
435 440 445	
aca gcc ggc cag caa ttg acg gag gtc att ggc tgc acg acc gtg acg	1392
Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val Thr	
450 455 460	
gtt ggt tcg gat gga aat gtg cct gtt cct atg gca ggt ggg cta cct	1440
Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu Pro	
465 470 475 480	
agg gta ttg tat ccg act gag aag ttg gca ggt agc aag atc tgt agt	1488
Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser	
485 490 495	
agc tcg gga aga ggt gct aca agc ccg ggt ggc tcc tcg ggt agt gtc	1536
Ser Ser Gly Arg Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly Ser Val	
500 505 510	
gag gtc act ttc gac gtt tac gct acc aca gta tat ggc cag aac atc	1584
Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln Asn Ile	
515 520 525	
tat atc acc ggt gat gtg agt gag ctc ggc aac tgg aca ccc gcc aat	1632
Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro Ala Asn	
530 535 540	
ggt gtt gca ctc tct tct gct aac tac ccc acc tgg agt gcc acg atc	1680
Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala Thr Ile	
545 550 555 560	
gct ctc ccc gct gac acg aca atc cag tac aag tat gtc aac att gac	1728
Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Asn Ile Asp	
565 570 575	
ggc agc acc gtc atc tgg gag gat gct atc agc aat cgc gag atc acg	1776
Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu Ile Thr	
580 585 590	
acg ccc gcc agc ggc aca tac acc gaa aaa gac act tgg gat gaa tct	1824
Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp Glu Ser	
595 600 605	
tag	1827

<210> 40
 <211> 608
 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Artificial

ES 2 383 366 T3

<400> 40

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

ES 2 383 366 T3

Ile Asp Thr Val Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr Asn
 225 230 235 240
 Lys Ala Ala Gly Val Tyr Cys Ile Gly Glu Val Leu Asp Gly Asp Pro
 245 250 255
 Ala Tyr Thr Cys Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn Tyr
 260 265 270
 Pro Ile Tyr Tyr Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly Ser
 275 280 285
 Met Asp Asp Leu Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys Pro
 290 295 300
 Asp Ser Thr Leu Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro Arg
 305 310 315 320
 Phe Ala Ser Tyr Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala Ala
 325 330 335
 Phe Ile Ile Leu Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln Glu
 340 345 350
 Gln His Tyr Ala Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr Trp
 355 360 365
 Leu Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala Ser
 370 375 380
 Ala Asn Ala Ile Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe Val
 385 390 395 400
 Thr Tyr Lys Asn Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Ala Met
 405 410 415
 Arg Lys Gly Thr Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn Lys
 420 425 430
 Gly Ala Ser Gly Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly Tyr
 435 440 445
 Thr Ala Gly Gln Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val Thr
 450 455 460
 Val Gly Ser Asp Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu Pro

ES 2 383 366 T3

```

/
465                               470                               475                               480

Arg Val Leu Tyr Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser
      485                               490                               495

Ser Ser Gly Arg Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly Ser Val
      500                               505                               510

Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln Asn Ile
      515                               520                               525

Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro Ala Asn
      530                               535                               540

Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala Thr Ile
      545                               550                               555                               560

Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Asn Ile Asp
      565                               570                               575

Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu Ile Thr
      580                               585                               590

Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp Glu Ser
      595                               600                               605

```

```

<210> 41
<211> 640
<212> PRT
<213> Aspergillus kawachii

```

```

<220>
<221> mat_peptide
<222> (22)..(640)

```

```

<400> 41

```

```

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

```

```

Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile
  -5                               -1  1                               5                               10

```

```

Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr
      15                               20                               25

```

```

Ala Thr Cys Asn Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln
      30                               35                               40

```

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

Ser Asp Pro Thr Leu Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro
285 290 295

Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu
300 305 310 315

Ser Tyr Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu
320 325 330

Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Asp Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr
335 340 345

Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala
350 355 360

Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Asp Tyr
365 370 375

Ile Thr Tyr Lys Asn Asp Pro Ile Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala
380 385 390 395

Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Ile Ile Thr Val Leu Ser Asn
400 405 410

Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly
415 420 425

Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val
430 435 440

Thr Val Asp Ser Asn Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu
445 450 455

Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys
460 465 470 475

Gly Gly Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr
480 485 490

Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr
495 500 505

Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile Thr Phe Glu
510 515 520

ES 2 383 366 T3

Glu Leu Val Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu Ser Gly Ser
525 530 535

Ile Ser Gln Leu Gly Glu Trp His Thr Ser Asp Ala Val Lys Leu Ser
540 545 550 555

Ala Asp Asp Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val Thr Val Ser
560 565 570

Leu Pro Val Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys Val Asp Glu
575 580 585

Gly Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val
590 595 600

Pro Glu Cys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Trp Arg
605 610 615

<210> 42
<211> 505
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

<220>
<221> mat_peptide
<222> (22)..(505)

<400> 42

Met Arg Leu Ser Thr Ser Ser Leu Phe Leu Ser Val Ser Leu Leu Gly
-20 -15 -10

Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile
-5 -1 1 5 10

Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr
15 20 25

Ala Thr Cys Asp Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln
30 35 40

Gly Ile Ile Asn His Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala
45 50 55

Ile Trp Ile Ser Pro Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp
60 65 70 75

Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn

ES 2 383 366 T3

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

ES 2 383 366 T3

Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Lys Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr
335 340 345

Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala
350 355 360

Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Ala Tyr
365 370 375

Ile Thr Tyr Ala Asn Asp Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala
380 385 390 395

Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn
400 405 410

Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly
415 420 425

Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val
430 435 440

Thr Val Asp Ser Ser Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu
445 450 455

Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys
460 465 470 475

Gly Gly Ser Gly Arg Leu Tyr Val Glu
480

<210> 43

<211> 476

<212> PRT

<213> Aspergillus oryzae

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(476)

<400> 43

Ala Thr Pro Ala Asp Trp Arg Ser Gln Ser Ile Tyr Phe Leu Leu Thr
1 5 10 15

Asp Arg Phe Ala Arg Thr Asp Gly Ser Thr Thr Ala Thr Cys Asn Thr
20 25 30

ES 2 383 366 T3

Ala Asp Gln Lys Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln Gly Ile Ile Asp Lys
35 40 45

Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Thr Pro
50 55 60

Val Thr Ala Gln Leu Pro Gln Thr Thr Ala Tyr Gly Asp Ala Tyr His
65 70 75 80

Gly Tyr Trp Gln Gln Asp Ile Tyr Ser Leu Asn Glu Asn Tyr Gly Thr
85 90 95

Ala Asp Asp Leu Lys Ala Leu Ser Ser Ala Leu His Glu Arg Gly Met
100 105 110

Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala Asn His Met Gly Tyr Asp Gly Ala
115 120 125

Gly Ser Ser Val Asp Tyr Ser Val Phe Lys Pro Phe Ser Ser Gln Asp
130 135 140

Tyr Phe His Pro Phe Cys Phe Ile Gln Asn Tyr Glu Asp Gln Thr Gln
145 150 155 160

Val Glu Asp Cys Trp Leu Gly Asp Asn Thr Val Ser Leu Pro Asp Leu
165 170 175

Asp Thr Thr Lys Asp Val Val Lys Asn Glu Trp Tyr Asp Trp Val Gly
180 185 190

Ser Leu Val Ser Asn Tyr Ser Ile Asp Gly Leu Arg Ile Asp Thr Val
195 200 205

Lys His Val Gln Lys Asp Phe Trp Pro Gly Tyr Asn Lys Ala Ala Gly
210 215 220

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

Pro Tyr Gln Asn Val Met Asp Gly Val Leu Asn Tyr Pro Ile Tyr Tyr
245 250 255

Pro Leu Leu Asn Ala Phe Lys Ser Thr Ser Gly Ser Met Asp Asp Leu
260 265 270

ES 2 383 366 T3

Tyr Asn Met Ile Asn Thr Val Lys Ser Asp Cys Pro Asp Ser Thr Leu
275 280 285

Leu Gly Thr Phe Val Glu Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Ala Ser Tyr
290 295 300

Thr Asn Asp Ile Ala Leu Ala Lys Asn Val Ala Ala Phe Ile Ile Leu
305 310 315 320

Asn Asp Gly Ile Pro Ile Ile Tyr Ala Gly Gln Glu Gln His Tyr Ala
325 330 335

Gly Gly Asn Asp Pro Ala Asn Arg Glu Ala Thr Trp Leu Ser Gly Tyr
340 345 350

Pro Thr Asp Ser Glu Leu Tyr Lys Leu Ile Ala Ser Ala Asn Ala Ile
355 360 365

Arg Asn Tyr Ala Ile Ser Lys Asp Thr Gly Phe Val Thr Tyr Lys Asn
370 375 380

Trp Pro Ile Tyr Lys Asp Asp Thr Thr Ile Ala Met Arg Lys Gly Thr
385 390 395 400

Asp Gly Ser Gln Ile Val Thr Ile Leu Ser Asn Lys Gly Ala Ser Gly
405 410 415

Asp Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly Tyr Thr Ala Gly Gln
420 425 430

Gln Leu Thr Glu Val Ile Gly Cys Thr Thr Val Thr Val Gly Ser Asp
435 440 445

Gly Asn Val Pro Val Pro Met Ala Gly Gly Leu Pro Arg Val Leu Tyr
450 455 460

Pro Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser
465 470 475

REIVINDICACIONES

1. Enzima híbrida que comprende una secuencia de aminoácidos de un módulo catalítico y una secuencia de aminoácidos de un módulo de unión a carbohidratos,
5 a) donde el módulo catalítico es una secuencia de alfa-amilasa que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n°.:8 y,
 b) donde el módulo de unión a carbohidratos consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad a la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°.:6.
10
2. Secuencia de ADN aislada codificando la enzima híbrida según la reivindicación 1.
3. Construcción de ADN comprendiendo la secuencia de ADN según la reivindicación 2.
- 15 4. Vector de expresión comprendiendo la secuencia de ADN según la reivindicación 2.
5. Célula huésped transformada con un vector de expresión según la reivindicación 4, esta célula huésped es capaz de expresar la secuencia de ADN aislada según la reivindicación 2.
- 20 6. Célula huésped según la reivindicación 5, esta célula huésped es de un hongo, una bacteria, una planta o un mamífero.
7. Método para licuefacción de almidón, donde un sustrato de almidón gelatinizado o granular se trata en medio acuoso con la enzima híbrida según la reivindicación 1.
25
8. Método según la reivindicación 7, comprendiendo contacto del almidón tratado con una levadura para producir combustible o etanol potable.
9. Método según la reivindicación 7, comprendiendo la fermentación del almidón tratado en un producto de fermentación, tal como ácido cítrico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato de calcio, gluconato de potasio, glucono delta lactona, eritorbato de sodio, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, cetonas, aminoácidos, ácido glutámico (monoglutaminato de sodio), penicilina, tetraciclina, enzimas, vitaminas, tales como riboflavina, B12, beta-caroteno u hormonas.
30
10. Proceso para la preparación de un producto a base de masa, comprendiendo la adición de la enzima híbrida según la reivindicación 1, a una masa.
35