

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 455 269**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010 E 10833977 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2504017**

54 Título: **Variantes de beta-glucosidasa recombinante para la producción de azúcares solubles de biomasa celulósica**

30 Prioridad:

25.11.2009 US 264608 P

16.06.2010 US 355511 P

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

15.04.2014

73 Titular/es:

CODEXIS, INC. (100.0%)

**200 Penobscot Drive
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**YANG, JIE;
ZHANG, XIYUN y
ANDOR, ATTILA**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 455 269 T3

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

Variantes de beta-glucosidasa recombinante para la producción de azúcares solubles de biomasa celulósica**Descripción**CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a la expresión de variantes de β -glucosidasa recombinantes y a su uso en la producción de azúcares solubles de biomasa celulósica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La biomasa celulósica es un recurso renovable significativo para la generación de azúcares solubles. Estos azúcares pueden usarse como reactantes en diversos procedimientos metabólicos, que incluyen fermentación, para producir biocombustibles, compuestos químicos y otros productos comercialmente valiosos. Aunque la fermentación de azúcares simples tales como glucosa en etanol es relativamente directa, la conversión eficaz de biomasa celulósica en azúcares solubles es exigente (véase, por ejemplo, Ladisch y col., 1983, Enzyme Microb. Technol. 5:82). La celulosa puede pretratarse químicamente, mecánicamente, enzimáticamente o de otras formas para aumentar la susceptibilidad de celulosa a la hidrólisis. Tal pretratamiento puede ir seguido de la conversión enzimática de celulosa a celobiosa, celo-oligosacáridos, glucosa y otros azúcares y polímeros de azúcar, usando enzimas que rompen los enlaces glucosídicos β -1-4 de celulosa. Estas enzimas se denominan conjuntamente "celulasas".

Las celulasas se dividen en tres subcategorías de enzimas: 1,4- β -D-glucano glucanohidrolasa ("endoglucanasa" o "EG"); 1,4- β -D-glucano celobiohidrolasa ("exoglucanasa", "celobiohidrolasa", o "CBH"); y β -D-glucósido-glucosidasa (" β -glucosidasa", "celobiasa" o "BGL"). Las endoglucanasas rompen enlaces internos y alteran la estructura cristalina de la celulosa, exponiendo cadenas de polisacárido de celulosa individuales ("glucanos"). Las celobiohidrolasas acortan gradualmente las moléculas de glucano, liberando principalmente unidades de celobiosa (un dímero de glucosa ligado en β -1,4 soluble en agua), además de glucosa, celotriosa y celotetraosa. Las β -glucosidasas fraccionan celobiosa en monómeros de glucosa.

Las celulasas con propiedades mejoradas para su uso en el procesamiento de biomasa celulósica reducirían los costes y aumentarían la eficiencia de producción de biocombustibles y otros compuestos comercialmente valiosos.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona una variante de β -glucosidasa aislada o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 60 % idéntica, algunas veces al menos aproximadamente el 65 % idéntica y frecuentemente al menos aproximadamente el 70 % idéntica a los residuos 20-870 de SEC ID N°: 2 (β -glucosidasa C1 natural), o que está codificada por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con SEC ID N°: 1 o el complemento exacto de SEC ID N°: 1, y que tiene al menos una sustitución, con respecto a SEC ID N°: 2, de un residuo de aminoácido descrito en el presente documento, en la que la variante tiene mayor actividad de β -glucosidasa que la proteína natural y/o es más termoestable que la proteína natural. También se proporcionan polinucleótidos que codifican las variantes de β -glucosidasa, vectores de expresión que comprenden dichos polinucleótidos y células huésped transformadas con los vectores de expresión.

La invención también proporciona un procedimiento de producción de una variante de β -glucosidasa cultivando una célula huésped transformada con un polinucleótido que codifica una variante de β -glucosidasa en condiciones adecuadas para la expresión de la β -glucosidasa. En algunas realizaciones, el polipéptido de β -glucosidasa se recupera del medio de cultivo o de las células transformadas y cultivadas.

La invención también proporciona una composición de enzima que comprende una variante de β -glucosidasa C1 aislada o recombinante. Opcionalmente, la composición de enzima también incluye al menos una enzima celulasa adicional.

En un aspecto relacionado y/u otros aspectos, la invención proporciona un procedimiento de conversión de un sustrato de biomasa, tal como celobiosa, en un azúcar fermentable poniendo en contacto una variante de β -glucosidasa con el sustrato de biomasa en condiciones adecuadas para la producción del azúcar fermentable. En una realización, el sustrato de biomasa se mantiene en un medio que contiene células que expresan una variante de β -glucosidasa. En una realización, la célula huésped recombinante que expresa una variante de β -glucosidasa también expresa al menos otra celulasa recombinante y/u otra enzima. Opcionalmente, el sustrato de biomasa se pretrata antes de poner en contacto el sustrato con una variante de polipéptido de β -glucosidasa.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. (A) Termoestabilidades de variantes de Bgl1 C1 mejoradas producidas en la cepa C1; la actividad enzimática residual después de 6 h de incubación a pH 5, 65 °C se determinó por ensayo de pNPG a pH 5, 50 °C

durante 20 min. N = 6-8; las barras de error representan ± 1 desviación estándar. (B) Termoestabilidades de variantes de Bgl1 C1 mejoradas producidas en la cepa C1; la actividad enzimática residual después de 24 h de incubación a pH 5, 65 °C se determinó por ensayo de pNPG a pH 5, 50 °C durante 20 min. N = 6-30; las barras de error representan ± 1 desviación estándar. (C) Correlación de termoestabilidad de Bgl1 C1 entre levadura y huéspedes C1.

Figura 2. (A) Las termoestabilidades de las variantes de Bgl1 C1 mejoradas 481, 269 y 3 se compararon con las de la enzima Bgl1 C1 nativa. La actividad enzimática residual después de 24 h de incubación a pH 4,5, 65 °C se midió usando pNPG como sustrato a pH 5, 50 °C durante 20 min. N=6-16; las barras de error representan ± 1 desviación estándar. (B) La termoestabilidad de la variante de Bgl1 C1 mejorada 664 se comparó con la de la variante 481. La actividad enzimática residual después de 4 h de incubación a pH 4, 65 °C se midió usando pNPG como sustrato a pH 5, 50 °C durante 20 min. N=6-24; las barras de error representan ± 1 desviación estándar.

Figura 3. Las termoestabilidades de las variantes de Bgl1 C1 mejoradas 3, 481, 664, 916, 885 y 871 se compararon con las de la enzima Bgl1 C1 nativa. La actividad enzimática residual después de 72 h de incubación a pH 4,5, 65 °C se midió usando pNPG como sustrato a pH 5, 50 °C durante 20 min. N=6-10; las barras de error representan ± 1 desviación estándar.

Figura 4. La actividad específica de Bgl1 C1 nativa se comparó con la de la variante 871 en un ensayo de celobiosa. Condiciones de ensayo: pH 4,5-5, temperaturas 55 °C-75 °C; 8 g/l de celobiosa, 18 h de reacción. La concentración de proteína se normalizó en reacciones. N+2; las barras de error representan ± 1 desviación estándar.

Figura 5. La Figura 5 muestra un alineamiento de secuencia de aminoácidos de Bgl1 C1 nativa (SEC ID N°: 2) con las secuencias de aminoácidos de las variantes 3 (SEC ID N°: 5), 269 (SEC ID N°: 7), 481 (SEC ID N°: 9), 647 (SEC ID N°: 15), 664 (SEC ID N°: 13), 871 (SEC ID N°: 17), 885 (SEC ID N°: 19) y 916 (SEC ID N°: 21).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. DEFINICIONES

Las siguientes definiciones se proporcionan para ayudar al lector. A menos que se defina de otro modo, todos los términos de la materia pretenden tener los significados comúnmente entendidos por aquellos expertos en las materias de biología molecular y microbiología. En algunos casos, términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento para claridad y/o para facilitar la referencia, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente que represente una diferencia sustancial con respecto a la definición del término como generalmente se entiende en la materia.

El término "celulosa" se refiere a una categoría de enzimas que puede hidrolizar celulosa (β -1,4-glucano o enlaces β -D-glucosídicos) a oligosacáridos más cortos, celobiosa y/o glucosa.

Los términos " β -glucosidasa" y "celobiasa" se usan indistintamente y se refieren a una β -D-glucósido glucohidrolasa que cataliza la hidrólisis de un dímero de azúcar, que incluye, pero no se limita a, celobiosa, con la liberación de un monómero de azúcar correspondiente. En una realización, una β -glucosidasa es una β -glucosidasa glucohidrolasa de la clasificación E.C. 3.2.1.21 que cataliza la hidrólisis de celobiosa en glucosa. Algunas de las β -glucosidasas tienen la capacidad para también hidrolizar β -D-galactósidos, β -L-arabinósidos y/o β -D-fucósidos y adicionalmente algunas β -glucosidasas pueden actuar sobre α -1,4-sustratos tales como almidón. La actividad de β -glucosidasa puede medirse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica, que incluyen los ensayos descritos en el presente documento más adelante.

El término "polipéptido de β -glucosidasa" se refiere a un polipéptido que tiene actividad de β -glucosidasa.

El término "polinucleótido de β -glucosidasa" se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de β -glucosidasa.

"Actividad celulolítica" engloba actividad de exoglucanasa (CBH), actividad de endoglucanasa (EG) y/o actividad de β -glucosidasa.

Los términos "exoglucanasa", "exo-celobiohidrolasa" o "CBH" se refieren a un grupo de enzimas celulasas clasificadas como E.C. 3.2.1.91. Estas enzimas hidrolizan celobiosa del extremo reductor o no reductor de celulosa.

Los términos "endoglucanasa" o "EG" se refieren a un grupo de enzimas celulasas clasificadas como E.C. 3.2.1.4. Estas enzimas hidrolizan enlaces glucosídicos β -1,4 internos de celulosa.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un ácido nucleico, polinucleótido, polipéptido, proteína u otro componente que se separa parcialmente o completamente de componentes con los que normalmente está asociado (otras proteínas, ácidos nucleicos, células, etc.).

El término "natural" como se aplica a un polipéptido (proteína) significa un polipéptido (proteína) expresado por un microorganismo que se produce naturalmente tal como bacteria u hongo filamentoso. Como se aplica a un microorganismo, el término "natural" se refiere al microorganismo no recombinante nativo. Con referencia a β -

glucosidasa C1, Bgl1 natural se refiere a la forma madura (secretada) de la proteína que tiene la secuencia de residuos 20-870 de SEC ID N°: 2.

5 Una "variante" como se usa en el presente documento significa un polipéptido de β-glucosidasa o polinucleótido que codifica una β-glucosidasa que comprende una o más modificaciones con respecto a β-glucosidasa C1 natural (Bgl1) o el polinucleótido natural tal como sustituciones, inserciones, deleciones y/o truncaciones de uno o más residuos de aminoácidos específicos o de uno o más nucleótidos o codones específicos en el polipéptido o polinucleótido.

10 Una "secuencia de β-glucosidasa de referencia" se refiere a una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias, tales como SEC ID N°: 2. Una secuencia de β-glucosidasa de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor. Generalmente, una secuencia de referencia tiene al menos 25 residuos de aminoácidos de longitud, al menos 50 residuos de longitud, al menos 100 residuos de longitud, al menos 150
15 residuos de longitud, al menos 200 residuos de longitud, al menos 300 residuos de longitud, al menos 350 residuos de longitud, al menos 500 residuos de longitud, al menos 600 residuos de longitud, al menos 700 residuos de longitud, o la longitud completa del polipéptido.

20 Un ácido nucleico (tal como un polinucleótido), un polipéptido o una célula es "recombinante" cuando es artificial o manipulado, o derivado de o contiene una proteína o ácido nucleico artificial o manipulada. Por ejemplo, un polinucleótido que se inserta en un vector o cualquier otra localización heteróloga, por ejemplo, en un genoma de un organismo recombinante, de forma que no se asocie a secuencias de nucleótidos que normalmente flanquean el polinucleótido como se encuentra en la naturaleza, es un polinucleótido recombinante. Una proteína expresada *in vitro* o *in vivo* de un polinucleótido recombinante es un ejemplo de un polipéptido recombinante. Asimismo, una
25 secuencia de polinucleótidos que no aparece en la naturaleza, por ejemplo, una variante de un gen que se produce naturalmente, es recombinante.

30 Una "propiedad mejorada" se refiere a un polipéptido de β-glucosidasa que presenta una mejora en cualquier propiedad con respecto a la β-glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2). Propiedades mejoradas pueden incluir elevada expresión de proteínas, termoactividad, termoestabilidad, actividad por pH, estabilidad por pH, especificidad de producto, elevada actividad específica, especificidad de sustrato, elevada resistencia a sustrato o inhibición de producto final, perfil de pH/temperatura alterado y estabilidad química.

35 Una variante con "actividad de β-glucosidasa mejorada", como el término se usa en el presente documento, significa una variante que muestra un aumento, con respecto a una secuencia de referencia, en la cantidad de hidrólisis de sustrato que se produce en un momento especificado bajo condiciones de reacción especificadas. La actividad de β-glucosidasa puede medirse usando una variedad de procedimientos conocidos en la técnica tales como los ensayos de celobiosa descritos en el presente documento más adelante. Para comparar la actividad de β-glucosidasa de dos proteínas recombinantemente expresadas puede compararse la actividad específica (actividad por mol de enzima o actividad por gramo de enzima). Alternativamente, las células que expresan y que secretan las proteínas recombinantes pueden cultivarse bajo las mismas condiciones y puede compararse la actividad de β-glucosidasa por
40 volumen medio de cultivo.

45 El término "termoestabilidad mejorada" como se usa en el presente documento significa una enzima de variante que muestra un aumento en la "actividad residual" con respecto a la enzima natural. La actividad residual se determina exponiendo la enzima (variante o referencia, por ejemplo, natural) a condiciones de estrés de temperatura elevada durante un periodo de tiempo y luego determinando la actividad de β-glucosidasa en condiciones en las que la enzima de referencia (por ejemplo, natural) tiene normalmente actividad. La actividad de β-glucosidasa de la enzima expuesta a condiciones de estrés ("a") se compara con la de un control en el que la enzima no se expone a las condiciones de estrés ("b"), y la actividad residual es igual a la relación a/b. Una variante con elevada
50 termoestabilidad tendrá mayor actividad residual que la enzima de referencia (por ejemplo, natural). Condiciones a modo de ejemplo para determinar la termoestabilidad se proporcionan en los ejemplos, más adelante. En una realización, las enzimas se exponen a condiciones de estrés de 65 °C a pH 5 durante 6 h, y se ensayan a 50 °C, pH 5, durante 1,5 h.

55 Los términos "identidad en porcentaje", "% de identidad", "porcentaje idéntico" y "% idéntico" se usan indistintamente en el presente documento para referirse al porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos que se obtiene por análisis de ClustalW (versión W 1.8 disponible de European Bioinformatics Institute, Cambridge, RU), contando el número de coincidencias idénticas en el alineamiento y dividiendo tal número de coincidencias idénticas entre la longitud de la secuencia de referencia, y usando los siguientes parámetros de ClustalW por defecto para lograr
60 alineamientos óptimos por parejas lentos/precisos - Penalización por hueco abierto: 10; Penalización por extensión de hueco: 0,10; matriz de peso de proteínas: serie Gonnet; matriz de peso de ADN: IUB; alineamientos por parejas lentos/rápidos de Toggle = Alineamiento SLOW o FULL.

65 Dos secuencias están "óptimamente alineadas" cuando están alineadas para puntuación de similitud usando una matriz de sustitución de aminoácidos definida (por ejemplo, BLOSUM62), penalización por existencia de huecos y penalización por extensión de hueco de manera que lleguen a la mayor puntuación posible para ese par de

secuencias. Las matrices de sustitución de aminoácidos y su uso en cuantificar la similitud entre dos secuencias son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Dayhoff y col. (1978), "A model of evolutionary change in proteins"; "Atlas of Protein Sequence and Structure", vol. 5, Supl. 3 (Ed. M.O. Dayhoff), pág. 345-352, Natl. Biomed. Res. Round., Washington, D.C.; y Henikoff y col. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919, ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. La matriz BLOSUM62 se usa frecuentemente como matriz de sustitución de puntuación por defecto en protocolos de alineamiento de secuencias tales como Gapped BLAST 2.0. La penalización por existencia de huecos se impone para la introducción de un único hueco de aminoácido en una de las secuencias alineadas, y la penalización por extensión de hueco se impone para cada posición de aminoácido vacía adicional insertada en un hueco ya abierto. El alineamiento se define por la posición de aminoácidos de cada secuencia en la que empieza y termina el alineamiento, y opcionalmente por la inserción de un hueco o múltiples huecos en una o ambas secuencias de manera que lleguen a la mayor puntuación posible. Mientras que el alineamiento y la puntuación óptimos pueden llevarse a cabo manualmente, el procedimiento se facilita por el uso de un algoritmo de alineamiento implementado por ordenador, por ejemplo, BLAST 2.0 con huecos, descrito en Altschul y col. (1997) Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (incorporado en el presente documento por referencia), y puesto a disposición para el público en la página web del Centro Nacional para Información Biotecnológica. Pueden hacerse alineamientos óptimos y múltiples alineamientos usando programas fácilmente disponibles tales como PSI-BLAST, que se describe por Altschul y col. (1997), arriba. Una herramienta de alineamiento útil es "T-Coffee" (Notredame y col., 2000, J. Mol. Bio. 302:205-17). Los alineamientos de T-Coffee pueden llevarse a cabo usando parámetros por defecto (Documentación técnica de T-Coffee, versión 8.01, julio de 2009, www.tcoffee.org).

"Correspondiente a", "referencia a" o "con respecto a", cuando se usan en el contexto de la numeración de una secuencia de aminoácidos o de polinucleótidos dada, se refiere a la numeración de los residuos de una secuencia de referencia especificada cuando la secuencia de aminoácidos o de polinucleótidos dada se compara con la secuencia de referencia.

Una "posición" de base de aminoácido o nucleótido se denota por un número que identifica secuencialmente cada aminoácido (o base de nucleótido) en la secuencia de referencia basándose en su posición con respecto al extremo N (o extremo 5'). Debido a deleciones, inserciones, truncaciones, fusiones y similares que deben tenerse en cuenta cuando se determina un alineamiento óptimo, en general el número de residuos de aminoácidos en una secuencia de prueba determinada contando simplemente desde el extremo N no será necesariamente la misma que el número de su posición correspondiente en la secuencia de referencia. Por ejemplo, en un caso en el que una variante tenga una deleción con respecto a una secuencia de referencia alineada, no habrá aminoácido en la variante que se corresponde con una posición en la secuencia de referencia en el sitio de deleción. Si hay una inserción en una secuencia de referencia alineada, esa inserción no se corresponderá con una posición de aminoácido numerada en la secuencia de referencia. En el caso de truncaciones o fusiones puede haber estiramientos de aminoácidos en tanto la secuencia de referencia como alineada que no se corresponden con ningún aminoácido en la secuencia correspondiente.

Los ácidos nucleicos "se hibridan" cuando se asocian para formar estructuras bicatenarias, normalmente en disolución. Los ácidos nucleicos se hibridan debido a una variedad de fuerzas fisicoquímicas bien caracterizadas, tales como enlace de hidrógeno, exclusión de disolvente, apilamiento de bases y similares. Como se usa en el presente documento, el término "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, tales como hibridaciones de Southern y Northern, depende de la secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. Una amplia guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, 1993, "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes", Parte I, Capítulo 2 (Elsevier, Nueva York), que se incorpora en el presente documento por referencia. Para polinucleótidos de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de baja a muy alta rigurosidad se definen como sigue: prehibridación e hibridación a 42 °C en 5xSSPE, 0,3 % de SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y tanto 25 % de formamida para rigurosidades bajas, 35 % de formamida para rigurosidades medias y medias-altas como 50 % de formamida para rigurosidades altas y muy altas, siguiendo procedimientos de transferencia Southern convencionales. Para polinucleótidos de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material de vehículo se lava finalmente tres veces cada vez durante 15 minutos usando 2xSSC, 0,2 % de SDS al menos a 50 °C (baja rigurosidad), al menos a 55 °C (rigurosidad media), al menos a 60 °C (rigurosidad media-alta), al menos a 65 °C (rigurosidad alta) y al menos a 70 °C (rigurosidad muy alta).

Los términos "cultivar" o "cultivo" se refieren a hacer crecer una población de células microbianas bajo condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido.

El término "poner en contacto" se refiere a la colocación de una enzima respectiva en proximidad suficientemente próxima a un sustrato respectivo para permitir que la enzima convierta el sustrato en un producto. Por ejemplo, combinar una disolución que contiene la enzima con el sustrato respectivo efectuará la puesta en contacto. Tal puesta en contacto también incluye incubar una célula que secreta una enzima en un medio que contiene un sustrato de enzima.

Como se usa en el presente documento, referencia a una célula "que metaboliza" un azúcar soluble u otro sustrato

para producir un producto final significa que el azúcar sirve de fuente de carbono y/o fuente de energía para una reacción metabólica en la célula. Normalmente, la célula es una célula microbiana tal como una célula fúngica o célula bacteriana.

5 Como se usa en el presente documento, el término “transformada” o “transformación” usado en referencia a una célula significa que una célula tiene una secuencia de ácidos nucleicos no nativa integrada en su genoma o como un plásmido episómico que se mantiene a través de múltiples generaciones.

10 El término “introducido” en el contexto de insertar una secuencia de ácidos nucleicos en una célula significa transfectado, transducido o transformado (conjuntamente “transformado”) o de otro modo incorporado en el genoma de, o mantenido como un episoma en, la célula.

15 El término “operativamente ligada” se refiere en el presente documento a una configuración en la que una secuencia de control se dispone apropiadamente en una posición con respecto a la secuencia codificante de la secuencia de ADN de forma que la secuencia de control influya en la expresión de un polipéptido.

20 Cuando se usa en el presente documento, el término “secuencia codificante” pretende cubrir una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto de proteína. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que normalmente empieza con el codón de iniciación ATG. La secuencia codificante normalmente incluye una secuencia de ADN, ADNc y/o de nucleótidos recombinante.

25 Una secuencia promotora, péptido señal u otra secuencia es “heteróloga” cuando está operativamente ligada a una secuencia de ácidos nucleicos o de proteínas con la que un promotor, péptido señal u otra secuencia no está asociado en la naturaleza.

30 Como se usa en el presente documento, el término “expresión” incluye cualquier etapa que participe en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

El término “vector de expresión” se refiere en el presente documento a una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de la invención, y que está operativamente ligado a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción.

35 Un polipéptido de variante de β -glucosidasa es “enzimáticamente activo” cuando tiene actividad de β -glucosidasa.

40 El término “pre-proteína” se refiere a una proteína que incluye una región del péptido señal del extremo amino (o secuencia conductora) unida. El péptido señal se escinde de la pre-proteína por una peptidasa señal antes de que la secreción produzca la proteína “madura” o “secretada”.

Como se usa en el presente documento, un “codón de iniciación” es el codón ATG que codifica el primer residuo de aminoácido (metionina) de una proteína.

45 En el contexto de identidad de secuencias, una referencia a “al menos x % de identidad de secuencias” en esta memoria descriptiva está prevista, a menos que se especifique de otro modo, para referirse a “x % de identidad de secuencias” además de para realizaciones alternativas en las que el % de identidad de secuencias se define por cada número entero de $(x + 1)$ % al 99 % de identidad, precisamente como si cada realización alternativa se enumerara explícitamente. Por ejemplo, referencia a “al menos el 70 % de identidad de secuencias con SEC ID N°: 2”, o “residuos de aminoácidos 20-870 de SEC ID N°: 2”, se refiere a realizaciones alternativas con al menos el 71 % de identidad de secuencias, al menos el 72 % de identidad, al menos el 73 % de identidad, al menos el 74 % de identidad, al menos el 75 % de identidad, al menos el 76 % de identidad, al menos el 77 % de identidad, al menos el 78 % de identidad, al menos el 79 % de identidad, al menos el 80 % de identidad, al menos el 81 % de identidad, al menos el 82 % de identidad, al menos el 83 % de identidad, al menos el 84 % de identidad, al menos el 85 % de identidad, al menos el 86 % de identidad, al menos el 87 % de identidad, al menos el 88 % de identidad, al menos el 89 % de identidad, al menos el 90 % de identidad, al menos el 91 % de identidad, al menos el 92 % de identidad, al menos el 93 % de identidad, al menos el 94 % de identidad, al menos el 95 % de identidad, al menos el 96 % de identidad, al menos el 97 % de identidad, al menos el 98 % de identidad, o al menos el 99 % de identidad con el aminoácido SEC ID N°: 2, o residuos 20-870 de SEC ID N°: 2. Para un alineamiento que extiende la longitud entera de 851 aminoácidos de los residuos 20-870 de SEC ID N°: 2, puede haber al menos 596 identidades entre una secuencia de variante y SEC ID N°: 2, algunas veces al menos 604, al menos 613, al menos 622, al menos 630, al menos 638, al menos 647, al menos 655, al menos 664, al menos 672, al menos 681, al menos 723, al menos 766, o al menos 808 identidades.

65 Como se usa en el presente documento, “C1” se refiere a una cepa fúngica descrita por Garg, A., 1966, “An addition to the genus *Chrysosporium* Corda” Mycopathologia 30: 3-4. “*Chrysosporium lucknowense*” incluye las cepas descritas en las patentes de EE.UU. n° 6.015.707, 5.811.381 y 6.573.086; publicaciones de patente de EE.UU. n°

2007/0238155, US 2008/0194005, US 2009/0099079; publicaciones de patente internacional nº WO 2008/073914 y WO 98/15633, e incluyen, sin limitación, *Chrysosporium lucknowense* Garg 27K, VKM-F 3500 D (nº de acceso VKM F-3500-D), cepa de C1 UV13-6 (nº de acceso VKM F-3632 D), cepa de C1 NG7C-19 (nº de acceso VKM F-3633 D) y cepa de C1 UV18-25 (VKM F-3631 D), todas las cuales se han depositado en la Colección para toda Rusia de microorganismos de la Academia de ciencias rusa (VKM), Bakhurhina St. 8, Moscú, Rusia, 113184, y cualquier derivado de las mismas. Aunque inicialmente se describió como *Chrysosporium lucknowense*, C1 puede considerarse actualmente una cepa de *Myceliophthora thermophila*. Derivados de C1 a modo de ejemplo incluyen organismos modificados en los que uno o más genes endógenos o secuencias se han deletado y/u modificado y/o se han introducido uno o más genes heterólogos o secuencias. Derivados incluyen UV18#100fΔalpl, UV18#100f Δpyr5 Δalpl, UV18#100.f Δalpl Δpep4 Δalp2, UV18#100.f Δpyr5 Δalpl Δpep4 Δalp2 y UV18#100.f Δpyr4 Δpyr5 Δalp 1 Δpep4 Δalp2, como se describen en el documento WO2008073914, incorporado en el presente documento por referencia.

La siguiente nomenclatura puede usarse para describir sustituciones en una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos con respecto a una secuencia de referencia: "R-#-V" en la que # se refiere a la posición en la secuencia de referencia, R se refiere al aminoácido (o base) en esa posición en la secuencia de referencia y V se refiere al aminoácido (o base) en la posición correspondiente en la secuencia de variante. Por ejemplo, para un polipéptido de variante descrito con referencia a SEC ID Nº: 2, "D369L" indica que en el polipéptido de variante el ácido aspártico en la posición 369 de la secuencia de referencia está sustituido por leucina, estando la posición de aminoácido determinada por el alineamiento óptimo de la secuencia de variante con SEC ID Nº: 2. Similarmente, "S182L/W" describe dos variantes: una variante en la que la serina en la posición 182 está sustituida por leucina y una variante en que la serina en la posición 182 está sustituida por triptófano.

Los siguientes usos se usan para describir posiciones de aminoácidos en variantes de Bgl1. Las posiciones de aminoácidos están numeradas en relación con la secuencia de referencia SEC ID Nº: 2, que es la secuencia de la pre-proteína de Bgl1 C1 natural (incluyendo el péptido señal). Los alineamientos para determinar un grado de identidad de secuencias (por ejemplo, "al menos el 70 % de identidad") o para describir deleciones (por ejemplo, deleciones de residuos en el extremo C de la proteína) son en relación con la forma secretada de la proteína Bgl1 natural, residuos 20-870 de SEC ID Nº: 2. Las sustituciones de bases de nucleótidos se numeran con respecto a SEC ID Nº: 1. Las sustituciones en el péptido señal (residuos 1-19 de SEC ID Nº: 2) se refieren a la secuencia de la pre-proteína Bgl1.

II. INTRODUCCIÓN

The hongo C1 produce una variedad de celulasas y otras enzimas que actúan de acuerdo para catalizar la descristalización e hidrólisis de celulosa para dar azúcares solubles. C1 se describió por Garg, 1966, "An addition to the genus *Chrysosporium corda*" Mycopathologia 30: 3-4. Véanse también las patentes de EE.UU. nº 6.015.707 y 6.573.086, que se incorporan en el presente documento por referencia para todos los fines.

El genoma de C1 se ha secuenciado al menos parcialmente, como se indica en las publicaciones de patente de EE.UU. US 2007/0238155, US 2008/0194005 y US 2009/0099079, incorporadas en el presente documento por referencia para todos los fines. La secuencia del gen 1 de β-glucosidasa C1 (*bgl1*) y la proteína codificada (Bgl1) se exponen en el presente documento como SEC ID Nº: 1 y 2 (véanse también las solicitudes pendientes de tramitación nº 61/247.379 y PCT/US10/50982, incorporadas en el presente documento por referencia). Obsérvese que estas secuencias se diferencian de las secuencias de Bgl1 de la publicación de patente US 2007/0238155.

Las variantes de β-glucosidasa C1 descritas en el presente documento son particularmente útiles para la producción de azúcares solubles de biomasa celulósica. En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de producción de glucosa poniendo en contacto una composición que comprende celobiosa con una variante de β-glucosidasa C1 recombinantemente expresada en condiciones en las que la celobiosa se convierte enzimáticamente en glucosa. En un aspecto, células huésped recombinantes que expresan una variante de β-glucosidasa pueden combinarse con celobiosa en condiciones en las que la β-glucosidasa se expresa (y en algunas realizaciones, secreta) por las células. Alternativamente, la proteína β-glucosidasa recombinante purificada o parcialmente purificada puede ponerse en contacto con celobiosa. En un aspecto de la presente invención, la puesta en contacto comprende cultivar una célula huésped recombinante en un medio que contiene celobiosa producido de una materia prima celulósica. Por ejemplo, las variantes de β-glucosidasa C1 descritas en el presente documento demuestran beneficio en reacciones de sacarificación conjuntamente con otras celulasas tales como celulasas de *T. reesei* (por ejemplo, CBH1, CBH2 y/o EG1 de *T. reesei* o variantes de las mismas, y/o caldo de *T. reesei*) y celulasas de C1 (véanse las patentes de EE.UU. nº 6.015.707, 5.811.381 y 6.573.086; publicaciones de patente de EE.UU. nº 2007/0238155, US 2008/0194005, US 2009/0099079; publicaciones de patente internacional WO 2008/073914 y WO 98/15633, todas incorporadas en el presente documento por referencia).

Diversos aspectos de la invención se describen en las siguientes secciones.

III. PROPIEDADES DE PROTEÍNAS β-GLUCOSIDASA PARA SU USO EN PROCEDIMIENTOS DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para expresar una proteína β -glucosidasa cultivando una célula huésped que comprende un vector o plásmido episómico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de Bgl1 C1, o que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una variante de Bgl1 C1 integrada en su genoma, en condiciones en las que se expresa la proteína β -glucosidasa o un fragmento enzimáticamente activo de la misma. Generalmente, la proteína expresada comprende un péptido señal que se elimina por la célula a medida que se secreta la enzima. En una realización, la transcripción de la secuencia que codifica la variante de Bgl1 C1 está controlada por un promotor heterólogo operativamente ligado.

Variantes de polipéptido de β -glucosidasa

La presente invención proporciona novedosas enzimas que son variantes de β -glucosidasa (Bgl1) C1. Las variantes de polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención son variantes de Bgl1 que presentan actividad de β -glucosidasa, normalmente mayor actividad de β -glucosidasa que la β -glucosidasa C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2), especialmente en condiciones relevantes para los procedimientos de sacarificación comerciales. También se incluyen variantes de polipéptido de β -glucosidasa que presentan mayor estabilidad en condiciones relevantes para procedimientos de sacarificación comerciales (por ejemplo, elevada termoestabilidad con respecto a β -glucosidasa natural).

La presente invención proporciona variantes de Bgl1 que tienen mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural (WT) y que tienen al menos una de las sustituciones encontradas en una variante de actividad elevada y/o termoestabilidad elevada descrita en el presente documento. Como se trata más abajo en más detalle, se preparó un polinucleótido que codifica la proteína Bgl1 C1 natural (WT) (SEC ID N°: 2). El polinucleótido se insertó en un vector de expresión como se describe en el Ejemplo 1, más adelante, se prepararon bibliotecas de polinucleótidos que codifican proteínas Bgl1 de variante por mutagénesis y evolución dirigida, y se evaluaron las propiedades (por ejemplo, actividad de β -glucosidasa y termoestabilidad) de variantes de Bgl1 individuales (véanse las Tablas 2-7 y Ejemplos 2-9, más adelante). Se identificaron varias sustituciones de aminoácidos y combinaciones de sustituciones en variantes con actividad superior a las naturales y/o termoestabilidad a las naturales. Véase la Tabla 2. Se seleccionó una variante con elevada actividad y termoestabilidad y se sometió a posterior mutagénesis y selección. Véase la Tabla 3. Una variante de esta ronda de mutagénesis y selección se seleccionó y se sometió a mutagénesis y selección adicionales. Véase la Tabla 4. Una variante de esta ronda adicional de selección se seleccionó y se sometió a mutagénesis y selección adicionales. Véase la Tabla 5. Dos variantes de esta ronda de selección se seleccionaron y se sometieron a mutagénesis y selección adicionales. Véanse las Tablas 6 y 7.

Más específicamente, la presente invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislado y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína C1 natural, y que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en K57; A88; I106; N112; Q119; T120; A123; R132; Y135; A136; A141; K142; L149; G158; P161; P172; T177; I179; G180; M181; S182; E183; K186; A197; G202; Y219; N220; S222; T224; I229; M234; F242; A243; V246; Q258; D274; V286; Q291; Q313; V318; A343; T354; T357; D358; E360; D369; P374; I375; A378; Q381; E385; S388; V390; A394; N398; E402; K406; I428; S434; N437; E449; Q474; A475; T482; S489; Y491; K530; N536; T540; T565; V674; R682; I867; E868; P870 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). "Sustitución", en este contexto, significa que el residuo en la proteína de variante es otro distinto al residuo mostrado. Por ejemplo, "A88" indica una variante que comprende un aminoácido distinto de alanina en la posición 88 (es decir, uno de los otros 19 aminoácidos que se producen naturalmente). En algunas realizaciones, el aminoácido en la proteína de variante no es ni el residuo natural ni un residuo que sea un sustituto conservativo para el residuo natural. Como se trata más adelante, en este contexto, un sustituto conservativo para un residuo es otro residuo en el mismo grupo identificado en la Tabla 1.

La presente invención proporciona adicionalmente una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 (WT), en la que la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2); tiene una sustitución en cada una de las posiciones Q291, D369 y E402; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en I106, A109, Q119, T120, R132, Y135, M181, Q215, A243, V246, Q258, A265, D274, N278, Q313, F314, G332, T357, D358, P374, E385, S434, N437, A475, S489, Y491, E493, K495, K497, S501, A503E N504, A505, N521, K530, N536, T540, D566, T591, A601, K610, T611, R612, S614, L620, G628, T635, V638, V648, D650, S652, N670, R672, V674, S676, T685, T687, A689, Q690, T699, D703, K708, Y715, A732, E742, L757, V775, T777 y D781 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido en la proteína de variante no es ni el residuo natural ni un residuo que sea un sustituto conservativo para el residuo natural. Como se trata más adelante, en este contexto, un sustituto conservativo para un residuo es otro residuo en el mismo grupo identificado en la Tabla 1.

La presente invención proporciona adicionalmente una variante de polipéptido de β-glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, en la que la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β-glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2); tiene una sustitución en cada una de las posiciones Q258, Q291, Q313, D369, E402, S434, A475, K495, y G628; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en A4, A15, E21, S22, K24, V25, H26, Q27, P29, L30, N45, D47, Q55, S58, A79, Q85, I06, A109, Q119, Y135, A136, P161, V175, G180, G202, G216, I221, L237, D244, V253, V260, L275, D311, F314, A343, D358, E360, Q381, E385, A394, A404, A405, K421, I428, P436, N437, M454, D470, R476, A477, Q479, T482, Y491, E493, E494, T496, S501, A505, N536, V559, V562, N588, S604, R612, G616, A617, G626, N627, F634, D646, D650, S652, R672, V673, T685, T687, A689, Q690, K708, Y715, Q716, A732, A748, D751, L757K, S764, R769, V775, T777, T783, T785, S787, S799, P806, K807, R817, E819, E822, T823, V840, V846, 1847, S848, Y850, K866 y P870 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido en la proteína de variante no es ni el residuo natural ni un residuo que sea un sustituto conservativo para el residuo natural. Como se trata más adelante, en este contexto, un sustituto conservativo para un residuo es otro residuo en el mismo grupo identificado en la Tabla 1.

La presente invención proporciona adicionalmente una variante de polipéptido de β-glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, en la que la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β-glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2); tiene una sustitución en cada una de las posiciones Q258, Q291, Q313, D369, E402, S434, A475, K495, G628, A689, y Y715; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en C8, L9, K24, V25, D47, S58, A79, Q85, I106, A109, A136, V175, L237, A243, V253, V260, D274, L275, F314, A343, Q381, E385, P436, N437, Q474, R476, A505, S550, N588, S604, G616, G626, D650, D651, S652, V674, T687, Q690, D709, E710, A732, D733, Y736N, L757, S764, T777, T783, T785, K807, M816, D844, V846, L869 y P870 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido en la proteína de variante no es ni el residuo natural ni un residuo que sea un sustituto conservativo para el residuo natural. Como se trata más adelante, en este contexto, un sustituto conservativo para un residuo es otro residuo en el mismo grupo identificado en la Tabla 1.

La presente invención proporciona adicionalmente una variante de polipéptido de β-glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, en la que la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β-glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2); tiene una sustitución en cada una de las posiciones D47, Q258, Q291, Q313, A343, D369, E402, S434, A475, K495, G628, T687, A689 y Y715; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en A79, Q85, V260, L275, F314, D395, P439, A505, D646, T693, N723, A730, A732, S764, R769, T827 y Y855 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido en la proteína de variante no es ni el residuo natural ni un residuo que sea un sustituto conservativo para el residuo natural. Como se trata más adelante, en este contexto, un sustituto conservativo para un residuo es otro residuo en el mismo grupo identificado en la Tabla 1.

La presente invención proporciona adicionalmente una variante de polipéptido de β-glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, en la que la variante comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β-glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2); tiene una sustitución en cada una de las posiciones I106, Q258, V260, Q291W, Q313, F314, D369, E402, S434, K495, G628, A689, Y715 y A732; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en A109, A343, A475, A505, A689, A79, C8, D47, L275, N315, Q85, T591 y T687 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, el aminoácido en la proteína de variante no es ni el residuo natural ni un residuo que sea un sustituto conservativo para el residuo natural. Como se trata más adelante, en este contexto, un sustituto conservativo para un residuo es otro residuo en el mismo grupo identificado en la Tabla 1.

TABLA 1

Aminoácidos básicos	Arginina, lisina, histidina
Aminoácidos ácidos	Ácido glutámico, ácido aspártico
Aminoácidos polares	Glutamina, asparagina
Aminoácidos hidrofóbicos	Leucina, isoleucina, valina
Aminoácidos aromáticos	Fenilalanina, triptófano, tirosina
Aminoácidos pequeños	glicina, alanina, serina, treonina, prolina, cisteína, metionina

En algunas realizaciones, el aminoácido en la proteína de variante no es ni el residuo natural ni un residuo que sea un residuo comúnmente intercambiado con el residuo natural como se define por los siguientes pares: Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile,

Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

Como se resume en la Tabla 2, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2), y que tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K57R; A88S; I106V; N112V; Q119E/L; T120M/Y/V/H; A123N; R132K/G/W; Y135I/Q/M; A136E; A141F; K142R; L149Q/M; G158D; P161S; P172A; T177I; I179M; G180E; M181Y; S182L/W; E183G/M/Q/K; K186R; A197V; G202M/V; Y219V; N220Y/S/L; S222Q/E; T224N; I229M; M234E/I; F242L; A243V; V246L; Q258N; D274Y/N; V286I; Q291W/A/F; Q313M; V318E; A343V/T; T354Q; T357L/P; D358K/N; E360R/A/D; P374Y; I375V; A378K/T; Q381V/D/I/L; D369Q/L/Y/C/A/I/P/E/K/R/F/M/H/V; E385L; S388W/C; V390I; A394G/V/L/P/Q; N398G; E402N; K406D; I428V; S434P; N437F/Y/D/L/W; E449Q; Q474I; A475F/Y/H/W/C; T482A; S489L; Y491 H/F; K530M/G; N536K; T540K; T565A/G/P; V674I; R682W; I867M; E868R; P870S (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, o más de las posiciones anteriormente identificadas.

Como se resume en la Tabla 3, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, en la que la variante es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2); tiene las sustituciones Q291W, D369H/L/R/Y y E402N; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en A109S, A243V, A265S, A475C/F/L/W, A503E, A505C, A601T, A689I, A732G/M, D274Y, D358E/K/N, D566G, D650F/V, D703K, D781N, E385L, E493A/V/Y, E742G, F314L/V, G332D, G628L/V/W, I106V, K495F/H/I/N/Q/V, K497R, K530C/D/E/I/M/N/V, K610S, K708F, L620M, L757K, M181Y, N278Y, N437D/F/I/K/L/V/W/Y, N504Y, N521C, N536K, N670D, P374Y, Q119E, Q215E/M, Q258H/N, Q313M, Q690A/K/R, R132H, R612H/P, R672A/D/F/G/I/S/T/V, S434P, S489I/UN/T, S501H/N/R, S614A/C/D/H/L/R/V/Y, S652D, S676C, S764F, T120H/Y, T357A, T540K, T591A/C/R, T611A/H/Q, T635A/I/V, T685V, T687C/F/K/L/M/W/Y, T699L, T777N, T779S, V246I, V638E/R/S, V648W, V674M, V775C, Y135Q, Y491F/H/L y Y715P (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 ó 70, o más de las posiciones anteriormente identificadas.

Como se resume en la Tabla 4, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2), tiene las sustituciones Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N y G628W; y tiene al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en A4V, A15V, A109S/T, A136L, A343C, A394G, A404S, A405T, A477G, A505C, A617V, A689I, A732G/M/S, A748T, A79E/G/M, D244H, D311N, D358K, D470N, D47I, D646N, D650F/N/Y, D751 N, E21Q/R, E360D, E385L, E493A/V/Y, E494K, E819A/L/V, E822A/G/K/M, F314L/V, F634A, G180E, G202M, G216L, G616D, G626D, H26R, I106V, I221V, I428V, I847T, K24G/UT, K421R, K708F, K807R, K866I/Q, L237Y, L275Y, L30K, L757K, M454E, N437W, N45H, N536K, N588F, N627H, P161S, P29M/Q/R, P436E/Q, P806L, P870S, Q119E, Q27H/R, Q381V, Q479R, Q55R, Q690A/H/K, Q716R, Q85N, R476Q, R612H, R672G, R769H, R817P, S22UR, S501C/R, S58G, S604I, S652D, S764F, S787G, S799N, S848N, T482A, T496A, T685V, T687C/K/M, T777N, T783H/Q, T785L, T823K, V175A, V253F, V25A/G/R, V260G/L, V559T, V562C/L, V673A, V775C, V840I, V846F, Y135M/Q, Y491F, Y715P y Y850H/Q (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, el polipéptido de Bgl1 no tiene una sustitución en la posición A475. Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más de las posiciones anteriormente identificadas.

Como se resume en la Tabla 5, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2), tiene las sustituciones Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, A689I y Y715P; y tiene al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: C8A, L9F, K24G/T, V25A, D47I/N, S58G, A79E/G/M, Q85H/N, I106V, A109S/T, A136L, V175A, L237Y, A243G, V253F, V260G, D274Y, L275F/Y, F314L/V, A343C/G, Q381V, E385L, P436Q, N437D/K, Q474I/L, R476G, A505C, S550C, N588F, S604A/C/I/V, G616D, G626D, D650N/Y, D651 E, S652D, V674I, T687C/K/W, Q690H/K, D709E, E710G, A732G/M/V, D733G, Y736N, L757I/K, S764F, T777N, T783A, T785L, K807R, M816L, D844G, V846F/L/Q, L869R y P870S (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, la variante de péptidos de Bgl1 no tiene una sustitución en la posición A475. Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente

incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más de las posiciones anteriormente identificadas.

5 Como se resume en la Tabla 6, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2), tiene las sustituciones D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, T687K, A689I, Y715P; y tiene al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: A79E/G/M, Q85N, V260G, L275Y, F314L/V, D395N, P439S, 10 A505C, D646N, T693A/E, N723G, A730S, A732G/M/V, S764Y, R769H, T827I y Y855 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, el polipéptido de Bgl1 de variante tiene la sustitución T687K o T687W en lugar de T687K. En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de Bgl no tiene una sustitución en la posición A475. Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 11, 12, 13, 14 ó 15, o más de las posiciones anteriormente identificadas.

20 Como se resume en la Tabla 7, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural, es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2), tiene las sustituciones I106V, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314L/V, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P y A732G; y tiene al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en: A109S/T, A343C/G, A475L, A505C, A79E/G/M, C8G, D47I, L275F/Y, N315D, Q85H/N y T591I, T687C/K/W (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). En algunas realizaciones, la proteína Bgl1 tiene adicionalmente la sustitución F314V. 25 Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 o más de las posiciones anteriormente identificadas.

30 La presente invención proporciona además una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural y que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el complemento de SEC ID N°: 1 (por ejemplo, sobre sustancialmente la longitud entera de un ácido nucleico exactamente complementario a SEC ID N°: 1) en la que el polipéptido codificado tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K57; A88; I106; N112; Q119; T120; A123; R132; Y135; A136; A141; K142; L149; G158; P161; P172; T177; I179; G180; M181; S182; E183; K186; A197; G202; Y219; N220; S222; T224; I229; 35 M234; F242; A243; V246; Q258; D274; V286I; Q291; Q313; V318; A343; T354; T357; D358; E360; P374; I375; A378; Q381; D369; E385L; S388; V390I; A394; N398; E402; K406; I428; S434; N437; E449Q; Q474I; A475; T482; S489; Y491; K530; N536; T540; T565; V674; R682; I867; E868; P870 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 40 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más de las posiciones anteriormente identificadas.

45 La presente invención proporciona además una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural y que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el complemento de SEC ID N°: 1 (por ejemplo, sobre sustancialmente la longitud entera de un ácido nucleico exactamente complementario a SEC ID N°: 1); en la que el polipéptido codificado tiene una sustitución en cada una de las posiciones Q291, D369 y E402; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en I106, A109, Q119, T120, R132, Y135, M181, Q215, A243, V246, Q258, A265, D274, N278, Q313, F314, G332, T357, D358, P374, E385, S434, N437, A475, S489, Y491, E493, K495, K497, S501, A503E, N504, A505, 50 N521, K530, N536, T540, D566, T591, A601, K610, T611, R612, S614, L620, G628, T635, V638, V648, D650, S652, N670, R672, V674, S676, T685, T687, A689, Q690, T699, D703, K708, Y715, A732, E742, L757, V775, T777 y D781 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o más de las posiciones 55 anteriormente identificadas.

60 La presente invención proporciona además una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 WT y que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el complemento de SEC ID N°: 1 (por ejemplo, sobre sustancialmente la longitud entera de un ácido nucleico exactamente complementario a SEC ID N°: 1); en la que el polipéptido codificado tiene sustituciones en cada una de las posiciones Q258, Q291, Q313, D369, E402, S434, A475, K495 y G628; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en A4, A15, E21, S22, K24, V25, H26, Q27, P29, L30, N45, D47, Q55, S58, A79, Q85, I106, A109, Q119, Y135, A136, P161, V175, G180, G202, G216, I221, L237, D244, V253, V260, 65 L275, D311, F314, A343, D358, E360, Q381, E385, A394, A404, A405, K421, I428, P436, N437, M454, D470, R476, A477, Q479, T482, Y491, E493, E494, T496, S501, A505, N536, V559, V562, N588, S604, R612, G616,

A617, G626, N627, F634, D646, D650, S652, R672, V673, T685, T687, A689, Q690, K708, Y715, Q716, A732, A748, D751, L757K, S764, R769, V775, T777, T783, T785, S787, S799, P806, K807, R817, E819, E822, T823, V840, V846, 1847, S848, Y850, K866 y P870 (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más de las posiciones anteriormente identificadas.

La presente invención proporciona además una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural y que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el complemento de SEC ID N°: 1 (por ejemplo, sobre sustancialmente la longitud entera de un ácido nucleico exactamente complementario a SEC ID N°: 1) en la que el polipéptido codificado tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en K57R; A88S; I106V; N112V; Q119E/L; T120M/Y/V/H; A123N; R132K/G/W; Y135I/Q/M; A136E; A141F; K142R; L149Q/M; G158D; P161S; P172A; T177I; I179M; G180E; M181Y; S182L/W; E183G/M/Q/K; K186R; A197V; G202M/V; Y219V; N220Y/S/L; S222Q/E; T224N; I229M; M234E/I; F242L; A243V; V246L; Q258N; D274Y/N; V286I; Q291W/A/F; Q313M; V318E; A343V/T; T354Q; T357L/P; D358K/N; E360R/A/D; P374Y; I375V; A378K/T; Q381V/D/I/L; D369Q/L/Y/C/A/I/P/E/K/R/F/M/H/V; E385L; S388W/C; V390I; A394G/V/LP/Q; N398G; E402N; K406D; I428V; S434P; N437F/Y/D/L/W; E449Q; Q474I; A475F/Y/H/W/C; T482A; S489L; Y491H/F; K530M/G; N536K; T540K; T565A/G/P; V674I; R682W; I867M; E868R; P870S (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más de las posiciones anteriormente identificadas.

La presente invención proporciona además una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural y que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el complemento de SEC ID N°: 1 (por ejemplo, sobre sustancialmente la longitud entera de un ácido nucleico exactamente complementario a SEC ID N°: 1) en la que el polipéptido codificado tiene una sustitución Q291W, D369H/UR/Y, y E402N; y tiene al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A109S, A243V, A265S, A475C/F/L/W, A503E, A505C, A601T, A689I, A732G/M, D274Y, D358E/K/N, D369H/L/R/Y, D566G D650F/V, D703K, D781 N, E385L, E402N, E493A/V/Y, E742G, F314V, G332D, G628L/V/W, I106V, K495F/H/I/N/Q/V, K497R, K530C/D/E/I/M/N/V, K610S, K708F, L620M, L757K, M181Y, N278Y, N437D/F/I/K/L/V/W/Y, N504Y, N521C, N536K, N670D, P374Y, Q119E, Q215E/M, Q258H/N, Q291W, Q313M, Q690A/K/R, R132H, R612H/P, R672A/D/F/G/I/S/T/V, S434P, S489I/UN/T, S501H/N/R, S614A/C/D/H/UR/V/Y, S652D, S676C S764F, T120H/Y, T357A, T540K, T591A/C/R, T611A/H/Q, T635A/I/V, T685V. T687C/F/K/L/M/W/Y, T699L, T777N, T779S, V246I, V638E/R/S, V648W, V674M, V775C, Y135Q, Y491F/H/L y Y715P (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más de las posiciones anteriormente identificadas.

La presente invención proporciona además una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína Bgl1 C1 natural y que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un ácido nucleico que se hibrida bajo condiciones rigurosas con el complemento de SEC ID N°: 1 (por ejemplo, sobre sustancialmente la longitud entera de un ácido nucleico exactamente complementario a SEC ID N°: 1) en la que el polipéptido codificado tiene una sustitución en la posición Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N y G628W; y tiene al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en A4V, A15V, A109S/T, A136L, A343C, A394G, A404S, A405T, A477G, A505C, A617V, A689I, A732G/M/S, A748T, A79E/G/M, D244H, D311N, D358K, D470N, D47I, D646N, D650F/N/Y, D751N, E21Q/R, E360D, E385L, E493A/V/Y, E494K, E819A/L/V, E822A/G/K/M, F314L/V, F634A, G180E, G202M, G216L, G616D, G626D, H26R, I106V, I221V, I428V, I847T, K24G/L/T, K421R, K708F, K807R, K866I/Q, L237Y, L275Y, L30K, L757K, M454E, N437W, N45H, N536K, N588F, N627H, P161S, P29M/Q/R, P436E/Q, P806L, P870S, Q119E, Q27H/R, Q381V, Q479R, Q55R, Q690A/H/K, Q716R, Q85N, R476Q, R612H, R672G, R769H, R817P, S22L/R, S501C/R, S58G, S604I, S652D, S764F, S787G, S799N, S848N, T482A, T496A, T685V, T687C/K/M, T777N, T783H/Q, T785L, T823K, V175A, V253F, V25A/G/R, V260G/L, V559T, V562C/L, V673A, V775C, V840I, V846F, Y135M/Q, Y491F, Y715P, Y850H/Q (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2). Combinaciones beneficiosas de las sustituciones enumeradas anteriormente incluyen cualquier combinación de sustituciones en cualesquiera 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más de las posiciones anteriormente identificadas. En ciertas realizaciones, la proteína Bgl1 C1 tiene las sustituciones Q258N, Q291W, Q313M, D369L, E402N, S434P, A475L, K495N y G628W.

Se apreciará que variantes de Bgl1 de la invención pueden englobar sustituciones de aminoácidos adicionales más allá de aquellas enumeradas anteriormente (tales como sustituciones conservativas adicionales) y pueden ser de longitud inferior a completa en comparación con la proteína Bgl1 C1 natural. Así, las variantes de Bgl1 de la invención pueden comprender inserciones o deleciones (por ejemplo, truncación en los extremos amino y/o carboxi) con respecto a los residuos 20-870 de SEC ID N°: 2. La forma secretada natural de la proteína Bgl1 C1 tiene aproximadamente 851 aminoácidos de longitud; variantes de la presente invención pueden ser más largas o más

cortas que la natural. Para ilustración y no limitación, en algunas realizaciones la variante puede ser más larga o más corta hasta el 10 % de la longitud natural, algunas veces hasta el 5 %, algunas veces hasta el 4 %, algunas veces hasta el 3 %, algunas veces hasta el 2 %, algunas veces hasta el 1 %.

5 El análisis de actividad de las secuencias de variantes se realizó según los procedimientos descritos en el documento WO 03/075129, USSN 10/379.378 presentado el 3 de marzo de 2003; R. Fox y col., 2003, "Optimizing the search algorithm for protein engineering by directed evolution", Protein Eng. 16(8):589-597, y R. Fox y col., 2005, "Directed molecular evolution by machine learning and the influence of nonlinear interactions", J. Theor. Biol. 234(2):187-199, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia, para identificar sustituciones con probablemente los mayores efectos significativos sobre la actividad.

15 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q119E; R132H; Y135Q; G180E; G202M/V; Q258N; D274Y; Q291W/A/F; D358K/N; D369L/Y/V/A/H/R/F/E/M/I/K/C/P/Q; P374Y; E385L; A394L; E402N; S434P; N437F/D/UW/Y; Q474I; A475F/Y/H/C/W; T482A; S489L; K530M; N536K; T540K, que se predice que son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la actividad de β -glucosidasa.

20 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones Q291W + D369L + E402N (como se encuentran en la variante 3), o las sustituciones Q291W + D369H/UR/Y + E402N. En algunas realizaciones, la secuencia incluye al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q258N/H, D358K/N, I106V, E385L, D274Y, K495H/I/N/Q, Q119E, Y135Q, G628W, R132H, N437I, S501R, P374Y, N437V, S614A, Q313M, L369H, S434P, N437W/D y Y491F. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es Q258N. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es D358K o Q258H. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es I106V, E385L, D274Y o K495H. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es K495I/N, Q119E, Y135Q o D358N. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es G628W, R132H, K495Q, N437I, S501R o P374Y. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es N437V, S614A, Q313M, L369H, S434P, N437W/D o Y491F. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la actividad de β -glucosidasa.

30 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N y G628W (como se encuentran en la variante 269), y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Y715P, S764F, E385D/L, A732G/M, A689I, A109T, T687M/C/K, L757K, Q381V/D, A109S, T777N, I106V, T823K, Q716R, V846F, T685V, T687K, D650Y, F314V/L, S652D y I428V. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es Y715P. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es S764F, E385L, A732G, A689I, o A109T, o E285D. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es T687M, A732M o L757K. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es Q381V, A109S, T777N, I106V, T823K, T687C o Q716R. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es V846F, T685V, T687K, D650Y, F314V/L, S652D, Q381D o I428V. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la actividad de β -glucosidasa.

45 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, A689I y Y715P (como se encuentran en la variante 481); o las sustituciones 258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I y Y715P; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A79E/M/G, Q85N, I106V, A109S/T, V260G, F314L/V, A343C/G, A505C, T687K/W/C y A732G/M/V. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es T687W. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es T687C o T687W, V260G, A343C, A732G o A109T. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es F314V/L, A732M/V, A109S o A343G. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es A79E, A505C, I106V o A79M/G. En algunas realizaciones, la variante Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la actividad de β -glucosidasa.

55 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, A475L, S434P, K495N, G628W, T687K, A689I y Y715P (como se encuentran en la variante 647) o las sustituciones D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, T687W, A689I y Y715P; o las sustituciones D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, T687K/W/C, A689I y Y715P; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A79G/E/M, Q85N, V260G, L275Y y F314L/V, y A732G/M. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es A79E, A79M, A79G, A732G, V260G o F314L. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es Q85N, F314V o A732M. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la actividad de β -glucosidasa.

65

- 5 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones I106V, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314L/V, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P y A732G (como se encuentran en la variante 664) y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D47I, A79G/E/M, A109T, A505C, A343C/G, T687W/C/K, N315D y L275F. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es A79E o A79G. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido sustituido es A109T, A79M, A505C o A343C. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido sustituido es T687W, T687C, D47I, T687K N315D o A343G. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la actividad de β -glucosidasa.
- 10 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en I106V; A123N; G180E; M181Y; M234E; Q258N; Q291W/F/A; T357L/P; D358K; E360D; D369L/V/C/Y/R/K/M/A/H/E/F/Q/P/I; P374Y; E385L; A394G; N437D/L; T482A; S489L; K530M; N536K; T540K, que se predice que son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la termoestabilidad.
- 15 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones Q291W, D369H/L/R/Y y E402N; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q313M, Q258N/H, N536K, Q119E, S489I/N/L/T, T120Y, K495N/V/I/H/Q, I106V, T120H, N437I/D/W/F/K/L/V/Y, E385L, M181Y, D274Y, S434P, S501R, T591C, Y135Q, Y491H/F, T540K, N521C, T591R, G628W y A475L. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es Q313M o Q258N. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es N437I, K495N, Q258H o N536K. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es Q119E, S489I, T120Y, K495V, S489L, I106V, T120H o N437D. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es N437W, K495I, N437F, E385L, K495H, N437K, N437L, S489T, M181Y, D274YS434P o N437V. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es S501R, T591C, Y135q, Y491H, R491F, T540K, N521C, T591R, K495K, G628W, N437Y, S489N o A475L. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la termoestabilidad.
- 20 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones Q258N, Q291W, Q313M, D369R, Q381V, E385L, E402N, S434P, A475L, K495N y G628W; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S764F, Y715P, E385UD, A732G/M, A109T/S, T687M/C/K, T777N, I106V, L475A, F314V, D650Y, L757K, Q716R, T685V o F314L. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es S764F o Y715P. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es E385L o A732G. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es A109T o T687M. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es T777N, I106V, I732M, T687C, T687K, E385D, L475A o A109S. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es P720P, F314V, D650Y, L757K, Q716R, T685V, o F314L. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la termoestabilidad.
- 25 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, A689I y 715P (como se encuentran en la variante 481); y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D47I, A79E, Q85N, I106V, A109S/T, V260G, L275Y, F314L/V, A505C, T687W/C/K y A732G/M/V. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es T687K/W/C. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido sustituido es I106V, V260G, F314V, A732G, A109T, F314L, A732M, Q85N o A109S. En algunas realizaciones, el al menos un aminoácido sustituido es F314, A732V, A505C, D47I, L275Y o A79E. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la termoestabilidad.
- 30 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, T687K/W, A689I y Y715P (como se encuentran en la variante 647); o las sustituciones D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, T687K/W, A689I y Y715P; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A79E/G/M, Q85N, V260G, L275Y, F314V/L, D395N y A732G, que se predice que son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la termoestabilidad. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es A79M, F314V o A79G. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es A79E, F314L, V260G, A85N, D395N o A732G.
- 35 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones I106V, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314L/V, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P y A732G (como se encuentran en la variante 664) y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A109S/T, A79G/E/M, D47I, Q85N/H, L314V y T591I. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es A109S, A79G, A109T o A79E. En algunas realizaciones, el al menos un residuo de aminoácido sustituido es D47I, A79M, A85N o A85H. Se predice que estas sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar la termoestabilidad.
- 40 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye al
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

menos una sustitución de un residuo de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en G180E; Q258N; Q291W/A/F; D358K; D369L/Y/V/A/H/R/F/E/M/I/K/C/P/Q; P374Y; E385L; N437D/L; T482A; S489L; K530M; N536K; y T540K, que se predice que son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar tanto la termoestabilidad como la actividad de β -glucosidasa.

5 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye Q291W, D369H/L/R/Y y E402N; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q258N/H, I106V, E385L, D274Y, K495H/I/N/Q, Q119E, Y135Q, G628W, N437I/V/W/D, S501R, Q313M, S434P y Y491F, que se predice que son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar tanto la termoestabilidad como la actividad de β -glucosidasa.

15 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N y G628W; o Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, K495N y G628W; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en S764F, Y715P, E385UD, A732G/M, A109T/S, T687M/C/K, T777N, I106V, F314V, D650Y, L757K, Q716R, T685V y F314L. Se predice que las sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar tanto la termoestabilidad como la actividad de β -glucosidasa.

20 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye Q258N, Q291W, Q313M, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, A689I y 715P (como se encuentran en la variante 481); y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A79E, Q85N, T687K/W/C, I106V, A109T/S, V260G, F314V/L, A505C y A732G/M/V. Se predice que las sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar tanto la termoestabilidad como la actividad de β -glucosidasa.

25 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, A475L, K495N, G628W, T687K/W, A689I y Y715P (como se encuentran en la variante 647); o D47I, Q258N, Q291W, Q313M, A343C, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, T687K/W, A689I y Y715P; y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en A79E/G/M, Q85N, V260G, F314V/L, A732G y L275Y. En algunas realizaciones, el residuo de aminoácido sustituido es A79E, A79M, A79G, Q85N, V260G, F314V, F314L o A732G. Se predice que las sustituciones son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar tanto la termoestabilidad como la actividad de β -glucosidasa.

35 Ciertas variantes de β -glucosidasa de la presente invención tienen una secuencia de aminoácidos que incluye las sustituciones I106V, Q258N, V260G, Q291W, Q313M, F314L/V, D369R, E402N, S434P, K495N, G628W, A689I, Y715P y A732G (como se encuentran en la variante 664) y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D47I, A79E/M/G y A109T, que se predice que son sustituciones altamente beneficiosas para aumentar tanto la termoestabilidad como la actividad de β -glucosidasa.

40 En particular, varias variantes con actividad y/o termoestabilidad superior comprenden sustituciones en la posición 369, con 14 residuos alternativos diferentes (es decir, no ácido aspártico) que aparecen en variantes beneficiosas. Se predice que las sustituciones en la posición 369 aumentan la actividad y/o termoestabilidad. Así, en un aspecto la invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) en la que el aminoácido en la posición 369 no es ácido aspártico. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 369 está seleccionado del grupo que consiste en Q, L, Y, C, A, I, P, E, K, R, F, M, H y V. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 369 es L (leucina), que parece particularmente beneficioso para β -glucosidasa y termoestabilidad.

50 Varias variantes con actividad y/o termoestabilidad superior comprenden sustituciones en la posición 291. Se predice que las sustituciones en la posición 291 aumentan la actividad y/o termoestabilidad. Así, en un aspecto la invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) en la que el aminoácido en la posición 291 no es glutamina. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 291 es W, A o F. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 369 es W (triptófano), que parece particularmente beneficioso para β -glucosidasa y termoestabilidad.

60 Varias variantes con actividad y/o termoestabilidad superior comprenden sustituciones en la posición 402. Se predice que las sustituciones en la posición 402 aumentan la actividad y/o termoestabilidad. Así, en un aspecto la invención proporciona una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (Bgl1) (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) en la que el aminoácido en la posición 402 no es ácido glutámico. En algunas realizaciones, el aminoácido no es ni ácido glutámico ni ácido aspártico. En algunas realizaciones, el aminoácido no es ácido glutámico, ácido aspártico o prolina. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 402 es asparagina, glutamina, histidina, lisina o arginina. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 402 es asparagina o

glutamina. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 402 es N (asparagina), que parece particularmente beneficioso para β -glucosidasa y termoestabilidad.

5 En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en:

M181Y + Q291W + E402N + S434P; R132K + L149M + Q313M + D369L + E385L + N437D; Q291W + D369L + E402N; Y135I + Q258N + Q474I; M181Y + Q291W + E360D + D369V + P374Y + T482A; Q258N + N437F + S489L + Y491 H; Q119E + Q258N + T357L + Q474I + S489L; Q258N + D369R + S489L + Y491 H; N220Y + Q258N + T357L + D369R + Q474I + Y491F; M234E + V246L + D358K + D369L + N398G + K530M; Y135Q + I229M + F242L + D369L + K530M; D369Q + P374Y + E402N + T540K; Y135Q + P172A + I179M + I229M + Q291A + D358K + D369L + N398G; R132K + D369L + E385L; Y135M + I179M + Q291A + D358K + D369L; Q291W + P374Y + E402N + S434P; Q119E + N220Y + Q258N + T357L + S489L; I179M + Q291A + D358K + D369L + I375V + S388W; Q291W + D369C; R132K + T354Q + D369L + N437L; Q291A + D369L + N398G + K530M; Q119E + Q258N + D274Y + S489L; Q119E + N220Y + Q258N + Q474I + S489L; M181Y + D369L; T120M + S222E + Q313M + T354Q + D369L + E385L; A4G + Q258N + D274Y + T357L + N437W + Q474I + Y491 H; R132G + D369L + N437D; S182L + Q313M + D369L + E385L; R132G + D369L + E385L; N112V + D358K + D369L + S388W + K530M; I106V + G180E + D369L + Q381V; I179M + Q291A + D369L; I179M + D358K + D369L + S388W; M234E + Q291A + D369L + N398G; I179M + Q291A + D358K + D369L + Q381I; Y135Q + N220L + Q291A + D369L + N398G; Y135I + D369L; S182L + D369L + E385L + N437L; T120Y + R132K + D369L + N437D; M234E + D369L + S388W + N398G + K530M; Y135M + I179M + D369L + V390I + K530M; L149Q + A197V + Q313M + D369L; T120M + R132K + D369L + N437L; T120M + R132W + L149M + Q313M + T354Q + D369L + E385L + N437D; A4G + Y135I + N220Y + Q258N + T357P + N437Y; D358K + D369L + S388W; Q258N + D274Y + N437F; D369L + S434P + T540K; G158D + I179M + Q291A + D358K + D369L + I375V + N398G + K530M; Y135I + D274Y + D369R; Q258N + D369L + Q474I + S489L + Y491F; R132W + S182W + D369L + E385L; S182L + T354Q + D369L + E385L; S222Q + T354Q + D369L + E385L + N437D + T565G; Y135M + P161S + Q291A + A343T + D369L + I375V + K406D; Q291W + D369C + T540K; D369L + P374Y + E402N; Y135I + A343V + D369F + S489L; M234E + D358K + D369L + S388W; T120M + L149Q + D369L + E385L; Q313M + D369L + E385L; T120Y + D369L + E385L; D369L + N437D + T565A; N112V + Q291A + D369L + I375V; R132W + L149Q + Q313M + T354Q + D369L; Y135M + D369L + I375V + N398G; D369L + E385L; T120M + S182L + Q313M + T354Q + D369L + E385L; T177I + Q291W + P374Y + T482A; Q258N + N437F; T120V + R132W + D369L + T565G; N112V + Q291A + D358N + D369E + S388C + K406D; Q291A + D358K + D369L + S388W + K406D; I106V + E360R + D369L + Q381V; M234E + Q291A + D369L + S388W + N398G; L149M + Q313M + D369L; M234I + Q291W + E360D + D369V + T482A; T120V + T354Q + D369L + E385L + T565P; M234I + Q291W + E360D + S434P; D369Y + I867M + E868R; R132W + S182L + Q313M + D369L; M234I + Q291W + P374Y + T482A; Y219V + M234I + D369C + P374Y + S434P; S182L + Q313M + D369L + E385L + N437L; M234E + D358K + D369L + S388W + K530M; R132G + S222E + D369L + E385L; R132K + L149M + S182L + D369L + N437L; T120H + Q313M + D369L; R132W + D369L; D369L + P374Y; N112V + N220L + Q291A + D369L + S388W + N398G; Q291A + D369L + I375V + K530G; R132K + L149M + S182L + T354Q + D369L + N437D + T565G; T120H + S222E + Q313M + D369L + N437D + T565G; A123N + Q291W + T482A + T540K; S222E + Q313M + T354Q + D369L + E385L; R132W + D369L + T565G; G202M + E360A + D369I + A394L; R132G + S222Q + Q313M + D369L; R132W + L149M + D369L; L149M + Q313M + T354Q + D369L; Q119L + G202M + D369L; M181Y + M234I + D369C; I179M + N220L + Q291A + D369L + I375V; S222E + Q313M + D369L + E385L + N437L; I179M + M234E + D358K + D369L + S388W + N398G; A123N + Y219V + Q291W + E360D + P374Y + S434P; D369L + E402N; D369L; Y219V + M234I + Q291W + T482A; Q291W + E360D + S434P; D369L + S434P; G180E + E360R + D369L; A123N + M181Y + Q291W + D369K + S434P + T540K; Q119E + T357L + D369M + S489L; Q119E + D369F + Y491H; Q119L + D369L; Q119E + N220Y + V286I + S489L; Q291A + D369L + Q381I; A475F; D369L + N536K; Q119E + Y135I + D369H; Q258N + S489L; Q119E + Y135I + N437Y; Q119E + Y135I + N437F + Y491F; Q119L + D369L + A394V; E183G + E360A + D369L + I428V; D369L + E449Q + N536K; Q119L + G202M + E360A + A475F; I106V + D369L; Y135I + D369M; M234I + D369C + S434P; D369L + A475Y; Q119E + Y135I + S489L; D369Y + N536K; E360R + D369L; G202V + A475H; D369L + Q381V + N536K; N220Y + Q258N + S489L + Y491F; Q258N + T357L + D369M; I179M + Q291A + D369L + Q381L + S388W + N398G; D369Y + A394G + N536K; Q291W + E360D + D369V + P374Y; T120M + L149Q + T354Q + D369L + E385L; S489L + Y491H; N220S + Q291F + D369L; D369C + S434P + T540K; V318E + D369L + I428V; E183M + G202M + E360A + D369L + A378K + A394V; A394G + N536K; Q291W + T540K; N220L + Q291A + D369L + Q381L + S388W + K530M; T120V + R132W + E385L + N437D; Q119L + E360A + D369L + A378K; D369A + N536K; G202V + D369L + A475H; Q381V + A475Y + N536K; S434P; I106V + G180E + D369Y + A394G; G180E + Q381V + A475H; Q119E + N220Y + Q474I; I106V + D369Q; A475Y + N536K; K142R + Y219V + Q291W + S434P + V674I; L149Q + S182L + Q313M + D369L + N437L; N112V + I179M + M234E + D369L + N398G; E360A + D369L + A378K; E360R + D369Y + N536K; E360R + D369A + Q381V + N536K; D369L + Q381D; N437F + S489L; E183M + G202M + V318E + D369I + A394L + I428V; E360D + D369L + E402N + S434P; Q119L + A141 F + G202M + A394L + I428V + A475F; T357L + D369R + S489L + Y491H; Y135I + Q258N + T357L; K142R + Q291W + E360D + D369C + E402N; E183M + A243V + D369L + A378K + A475F; R132K + L149M + E385L; D369Y; M234I + E402N + S434P; N437Y; Q119E + N437F; N536K; Q119L + E183Q + G202M + D369P; N112V + I179M + Q291A + D358K + K406D; A123N + Q291W + T540K; D369I + A394L + I428V; A88S + N536K; Q119E + Y135I + N437F; A141 F + G202M + E360A + D369P + A378K; A123N + T482A; Q313M + N437D; E360R + D369Y; E183M + G202M + A475F; Q119L + E360A + A394V + A475F; D369L + A378K;

ES 2 455 269 T3

5 E360R + D369L + A394G; M181Y + D369E + S434P; D369I; N112V + Y135Q + I375V + K406D + K530M + P870S; Q119E + Y135I + N220Y + Q258N; D369P + A394V + I428V; V318E + D369L; K186R + N536K; Q119L + D369L + A378K; M234I + D369K + S434P; N112V + I179M + N220L + Q291A + Q381I + S388W + N398G; E402N + S434P; Q119L + A141 F + G202M + A394Q; Q313M + T354Q + N437D; N112V + M234E + D369L + I375V + K406D; Q119E + A136E + N220Y; Q381D + A394G + N536K; Q119L + E183G + D369Q + A378T + V390I; Y135I + T357L + Q474I + S489L + Y491F; D369E + A394P + I428V; N112V + Q291A + Q381I + N398G; E360R + N536K; E360D + D369C; R132W + S182L + E385L; I179M + Q291A + D358K + N398G + K530G; N220Y + Q258N + T357L; T224N + D274Y + T357L + N437F; N437D; M234I + E360D + T482A; A141 F + G202M + D274N + V318E + E360A + I428V; D369Q; N112V + N220L + D358K + D369L + I375V + Q381I + N398G; Y135I + D369F; A243V + V318E + E360A + A475W; 10 N220L + D369L + Q381I + S388W + N398G + K530G; S489L; K142R + Y219V; Y135I + N220Y + Y491F; S182W + T354Q + E385L; I179M + D358K + S388W; L149M + Q313M + T565P; R132G + E385L; V318E; Q119L + E183K; R132W + E385L; E183G + V318E + E360A + A394Q + A475C; E183M + G202M + E360A; A394G; D369P; Y135M + Q291A + S388W + N398G; Y219V + D369C; A394V + I428V; Q119L; Y135I; E360R + D369Q + Q381D + N536K; N220L + M234E + Q291A + I375V + K530M; Q119L + G202M + E360A; N220Y + Q258N + D369R; M181Y + M234I + Q291W + E402N; A394V; T120M + L149Q + Q313M; Q119L + V318E + I428V; E360R + Q381I; K57R + G202M + 15 E360A + A394V; I179M + D358K + I375V + Q381I; E360A; I179M + R682W; E360A + I428V; y D369K + P374Y (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N^o: 2).

20 En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N^o: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en:

25 I106V + Q258N + Q291W + D369L + E402N + S434P; I106V + Y135Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369H + E402N + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; I106V + Q258N + Q291W + Q313M + D369H + E402N + S434P + A475C + K495I + T540K + G628W; I106V + Q258N + Q291W + D369R + E402N + S434P + K495H + G628L; D274Y + Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437I + S489N; Q258N + Q291W + Q313M + D369H + E402N + S434P + T540K; I106V + Q258N + Q291W + D369L + E402N + S434P + A475F + K495H + G628V; Q258N + Q291W + Q313M + D369L + E402N + S434P + A475C + K495I + G628W; I106V + Y135Q + M181Y + Q258N + Q291W + Q313M + D369L + E402N + 30 S434P + K495N; Y135Q + Q258N + Q291W + D369L + E402N + K495N; Q119E + D274Y + Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437V + S489N + S614A; Y135Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369L + E402N + S434P + A475F + K495N + G628V; R132H + Q258N + Q291W + D369Y + E402N + K495Q; Y135Q + Q258N + Q291W + D369L + E402N + S434P + A475F + K495H; Y135Q + Q258N + Q291W + D369R + E402N + S434P + K495I + G628V; I106V + M181Y + Q258N + Q291W + D369L + E402N; I106V + Q258N + Q291W + D369H + E402N + S434P + A475F + K495F + G628V; Q258N + Q291W + Q313M + D369L + E402N + S434P + G628V; Q258N + Q291W + D369L + E402N + A475F + K495I; Q119E + D274Y + Q291W + D369L + E385L + E402N + N437I + S489N + K530C; I106V + Y135Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369Y + E402N + S434P + A475F + K495H + T540K; Q119E + Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N; I106V + M181Y + Q258N + Q291W + Q313M + D369H + E402N + S434P + A475L + K495Q + G628V; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437D; Q258N + Q291W + D369R + E402N + S434P + G628V; Q258N + Q291W + Q313M + D369H + E402N + S434P + G628L; Q258N + Q291W + D369L + E402N; D274Y + Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437F + S614D; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437L + K530V; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437V + S489L + K530N; Q258N + Q291W + D369L + E402N + S434P + A475F + K495F + T540K; M181Y + Q291W + Q313M + D369Y + E402N; A243V + D274Y + Q291W + D358K + D369L + E402N + N437I + K530C; Q119E + D274Y + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437V + K530V + S614A; Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437W + K530C + S614A; Q119E + D274Y + Q291W + D369L + E385L + E402N + N437W; D274Y + Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437I + K530N + S614V; M181Y + Q258N + Q291W + Q313M + D369L + E402N + S434P; A109T + Q291W + D369L + E402N; Q119E + Q291W + D369L + E385L + E402N + N437Y + S489I + K530N; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437D; D274Y + Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437W + K530V + S614D; Q258N + Q291W + D369R + E402N + A475W + K495H + G628V; A109S + Q291W + D369L + E402N; Q119E + D274Y + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437L + S614A; Q291W + D369L + E402N + E493Y + N504Y + 55 T611A; Q119E + D274Y + Q291W + D358K + D369L + E402N + S614V; D274Y + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437L + K530N + S614A; Q258H + Q291W + Q313M + D369R + E402N + A475F + K495N + G628L; Q258N + Q291W + Q313M + D369Y + E402N + A475W + K495V + T540K + G628W; D274Y + Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437W + S614V; I106V + Y135Q + Q291W + Q313M + D369L + E402N + A475L + K495Q; Q258N + Q291W + D369R + E402N + S434P + A475F + G628V; Q119E + D274Y + Q291W + D369L + E385L + E402N + N437V; D274Y + Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437Y + S489L + K530V; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E402N; Q291W + D369L + E402N + K495V + S501 R + A503E + K530N + T611H; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437V + S489I + K530C; Q119E + Q291W + D358K + D369L + E402N + N437L + S489N; D274Y + Q291W + D369L + E385L + E402N + N437W + K530C + S614D; Q258N + Q291W + D369R + E402N + A475F + K495N + T540K + G628V; Q291W + D369L + E402N + E493V + N504Y; Q291W + D358E + D369L + E385* + E402N + S489T; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + A475L + K495V + A601T + G628W; D274Y + Q291W + D358N + D369L +

E385L + E402N + S489N + S614C; D274Y + Q291W + D358K + D369L + E402N + N437V + S489L + K530C + S614A; Q119E + D274Y + Q291W + D358E + D369L + E402N + N437D; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437L + S614R; D274Y + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437Y + K530V; D274Y + Q291W + D358E + D369L + E402N + N437Y + S489N + K530N + S614V + D781 N; Q258H + Q291W + D369* + E402N + S434P + T540K + G628L; Q119E + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437L + S489N + K530V; Q258N + Q291W + D369L + E402N + G628V; Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + S489I + K530N; Q119E + Q291W + D369L + E385L + E402N + S489N + K530V + S614A; I106V + Y135Q + Q291W + D369L + E402N + S434P + A475F + K495H + G628L; Q119E + Q291W + D358K + D369L + E402N + N437V + K497R + S614A; Q119E + D274Y + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437L; D274Y + Q291W + D358K + D369L + E402N + N437L + S489I + K530V + S614A; I106V + Q291W + Q313M + D369L + E402N + S434P + A475W + K495N + G628W; Q291W + D369L + E402N + A505C + L620M + T635I; Q291W + D369L + E402N + E493A + N504Y + A505C + L620M + T635A; D274Y + Q291W + D358N + D369L + E402N + S489N + K530C + S614A; D274Y + Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437W + K530D; Q291W + D369L + E402N + S489N + K495H + S501 R + K530N; D274Y + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437D + K530C + S614H; Q119E + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437W + S489N + K530E + S614A; Q291W + D369L + E402N + E493Y + N504Y + N521C + T591A + R612P + L620M + T635I; Q291W + D358K + D369L + E385L + E402N + N437I + K530M + S614L; Q291W + D369L + E402N + R672I; D274Y + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437L + S489L; A265S + Q291W + D369L + E402N; Q215M + Q291W + D369L + E402N; Q291W + D369L + E402N + E493V + N504Y + N521 C + T591A + L620M + T635I; Q119E + D274Y + Q291W + D369L + E385L + E402N + N437L + S489N + K530M + S614D; Q119E + Q291W + D369L + E385L + E402N; Q291W + D369L + E402N + E493A + N504Y + A505C + L620M + T635A; Q119E + Q291W + D369L + E385L + E402N; Q291W + D369L + E385L + E402N + S614Y; I106V + Y135Q + M181Y + Q258N + Q291W + D369L + E402N; Q119E + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437W + K530V; Q215E + Q291W + D369L + E402N; Q291W + D369L + E402N + N504Y + N521C + T591A + R612H + L620M + T635I; Q119E + D274Y + Q291W + D358K + D369L + E402N + N437Y + K530I; Q258H + Q291W + D369L + E402N + K495N; Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437D + S489N + K530I; Q291W + D369L + P374Y + E402N + Y491L + S501 R; Q258N + Q291W + Q313M + G332D + D369H + E402N + S434P; Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437F + S489L + K530V; Q291W + D369L + E402N + R672S; Q291W + D369L + E402N + T687M; Q291W + F314V + D369L + E402N; Q258N + Q291W + T357A + D369H + E402N + S434P + K495F; Q291W + D369L + P374Y + E402N + Y491F + S501R + N521C; Q291W + D369L + E402N + Q690K; Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437F + K530V + S614A; Q291W + D369L + E402N + R672A; Q291W + D369L + E402N + R672T; Q291W + D369L + E402N + D703K; D274Y + Q291W + D369L + E402N; Q291W + D369L + E402N + R672F; Q291W + D369L + E402N + R672D; Q291W + D369L + E402N + Y491F + S501 R + N536K + D566G; Q291W + D369L + E402N + A732G; Q291W + D369L + E402N + E493Y + N504Y + N521C + T591 C + R612P + L620M; I106V + Y135Q + Q291W + D369L + E402N + A475F + G628W; Q291W + D369L + E402N + R672G; Q291W + D369L + E402N + S614H; Q291W + Q313M + Q291W + D369L + E402N + T540K; Q291W + D369L + E402N + K708F; Q291W + D369L + P374Y + E402N + S501H; Q291W + D369L + E402N + Y715P; Q291W + D369L + E402N + A732M; Q291W + D369L + E402N + E493A + N504Y + N521C + D566G + R612P + L620M; Q291W + D369L + E402N + Q690R; D274Y + Q291W + D369L + E385L + E402N + N437V + K530I + S614D; Q291W + D369L + E402N + L757K; Q291W + D369L + E402N + T687Y; Q291W + D369L + E402N + Y491H + S501R + N521C + T591A; Q291W + D369L + E402N + V775C; Q291W + D369L + E402N + R672V; Q291W + D369L + E402N + N670D; Q291W + D369L + E402N + T779S; Q291W + D369L + E402N + V638R; Q291W + D369L + E402N + T687F; Q291W + D369L + E402N + T687L; Q291W + D369L + E402N + K610S; Q291W + D369L + E402N + Y491 L + S501R + N521C; D274Y + Q291W + D358E + D369L + E402N + K530V + S614V; I106V + M181Y + Q258N + Q291W + D369R + E402N + S434P + A475W + K495V + T540K + G628V; Q291W + D369L + E402N + N536K; Q291W + D369L + E402N + E493V + N504Y + R612P + L620M; Q291W + D369L + E402N + S676C; Q291W + D369L + E402N + T540K + G628W; Q291W + D369L + E385L + E402N + N437D + S489L + K530C + S614D; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437F + S489N + S614L; Q291W + D369L + E402N + S434P + A475W + K495V; Q291W + D369L + E402N + A689I; Q291W + D369L + E402N + E493A + N504Y + N521C + D566G + R612H + L620M; Q291W + D369L + E402N + V638S; Q291W + D369L + E402N + V648W; Q291W + D369L + E402N + D650V; Q291W + D369L + E402N + V674M; Q291W + D369L + E402N + V638E; I106V + Q291W + D369L + E402N; Y135Q + Q291W + D369L + E402N; Q291W + D369L + E402N + S764F; Q291W + D369L + E402N + E493A + N504Y + A505C + N521C + T591A + R612P; Q291W + D369L + E402N + S489N + K495Q + S501 R + K530N + T611Q; Q291W + D369L + E402N + T685V; I106V + Q291W + D369L + E402N + S434P + A475C + K495N + T540K; Q119E + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437D + K530N + S614V; Q291W + D369L + E402N + T687K; Q291W + D369L + E402N + S652D; Q291W + D369L + E402N + A475F + K495Q + T540K + G628L; Y135Q + Q291W + D369L + E402N + G628V; Q291W + D369L + E402N + E493Y + A505C + N521 C + T591A + L620M; Q291W + D369L + E402N + T687W; Q291W + D369L + E402N + D650F; Q291W + D369L + E402N + T687C; Q291W + D369L + E402N + S434P + K495N + G628V; Q291W + D369L + E402N + S501 N; D274Y + Q291W + D369L + E402N + N437K + S489I + K530V + S614L; Q291W + D369L + E402N + T699L; Q119E + V246I + Q291W + D358E + D369L + E402N + S614L; Q291W + D369L + E402N + N504Y + N521C + D566G + L620M + T635A; Q291W + D369L + E402N + E493Y + N504Y + D566G + T591A + R612P + L620M; Q291W + D369L + E402N + N536K + T591 A; Q291W + D369L + E402N + Q690A; Q291W + D358K + D369L + E402N + N437L + S489I + K530D; Q119E + D274Y + Q291W + D358E + D369L + E385L + E402N + N437V + S489N + K530M + S614H; Q291W + D369L + P374Y + E402N + Y491 L; Q291W + D369L + E402N + S501 R; Q291W + D369L + E402N + Y491 L + N521C + N536K; Q291W + D369L + E402N + E493Y + N504Y +

ES 2 455 269 T3

5 N521C + T591C + R612P + L620M + T635V; Q119E + Q291W + D358N + D369L + E385L + E402N + N437I + S489I + S614L; T120Y + Q291W + D369L + E402N + S501R + N521C + D566G; Q291W + D369L + E402N + Y491 L + N521C; Q291W + D369L + E402N + Y491 L + S501 N + D566G + T591A; D274Y + N278Y + Q291W + D358E + D369L + E402N + N437Y + S489L + K530E; I106V + Q291W + D369L + E402N + S434P + A475W + K495F + T540K + G628V; Q119E + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437Y + E742G; Y135Q + Q291W + D369Y + E402N + A475F + K495F; T120H + Q291W + D369L + E402N + Y491H + S501 H + T591C; Q119E + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437F + S489N + K530E + S614L; Q119E + D274Y + Q291W + D358N + D369L + E402N + N437I + S489N + K530V + S614Y; T120Y + Q291W + D369L + E402N + N521C + N536K; Q291W + D369L + E402N + Y491F + S501 N + N521C + N536K + T591R; Q291W + D369L + E402N + S501 N + N521C + D566G + T591R; Q291W + D369L + E402N + Y491 L + S501 R + N536K + D566G + T591 R; y D274Y + Q291W + D358E + D369L + E402N + N437Y + S489N + K530I + S614L (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2).

15 En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 WT (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en:

20 Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T685V + Y715P; I106V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S764F; A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + Q381V + E402N + S434P + A475L + K495N + S501R + G628W + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S764F; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E385L + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N627H + G628W + A732G; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T685V + Y715P + T777N; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + D650Y + Q716R + L757K; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + V562L + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A505C + G628W + S764F; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y715P + E819V; A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T685V + Y715P + V846F; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Q690K; D47I + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; E21Q + V175A + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + E360D + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + L757K; Q258N + Q291W + Q313M + F314L + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S604I + N627H + G628W + A732G; A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + V775C; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S764F; P29Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; A136L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S764F + P870S; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E385L + E402N + S434P + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687M; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N588F + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D358K + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Y135M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T785L; A79G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S848N; I106V + Q258N + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A732G; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + L757K; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N627H + G628W + T687M + E822K; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G616D + G628W; A79M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; I106V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; F314V + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A617V + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + P436Q + A475L + K495N + G626D + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687C; Q85N + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; A109S + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N536K + G628W; S58G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; E21Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + Q381V + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + L275Y + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L +

K495N + A505C + G628W; E21R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; V25A + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; H26R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; L30K + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; N45H + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; P29M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; P29R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; R672G; Q258N + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A505C + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687K; Q27R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; V253F + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; S22L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Q690H; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S799N; Q258N + Q291W + Q313M + F314V + E360D + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + E822M; K24T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S787G; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + R612H + G628W + L757K + S787G; S22L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + Q479R + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687K + E822M; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + M454E + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + V562C + G628W; S22R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; V25G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; V25R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; V25G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q27H + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; K24L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + D650F + L757K; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + T482A + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A617V + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S501C + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + K495N + N536K + G628W + R817P; G180E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + R476Q + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T777N; Q119E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; A109S + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + K495N + G628W + S848N; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y850H; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + P436E + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + R769H + E819A; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + T496A + G628W; Q258N + V260L + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; D244H + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + E819V; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S652D; Q258N + Q291W + D31 1 N + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + R612H + G628W + A6891 + K866I; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T783H; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T823K; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + D650N + S787G; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + K708F; Q258N + Q291W + Q313M + E360D + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S652D; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + E822G; L237Y + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + L757K; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S764F; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + D650F; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S848N; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + T496A + N536K + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + K421 R + S434P + A475L + K495N + G628W + T777N; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N627H + G628W + E822M; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + F634A; A4V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + N437W + A475L + K495N + G628W; Y135Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P +

5 A475L + K495N + G628W; Y135Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + V673A + T685V; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + L757K + P806L; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + V559T + G628W; Y135M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + V775C; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N627H + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + A405T + S434P + A475L + K495N + G628W; I221V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S501 R + G628W + T685V; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + A394G + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + L757K;

10 P161S + Q258N + Q291W + Q313M + D358K + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G616D + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + K807R; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A505C + G628W + E822G; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E493V + K495N + G628W + S652D; A15V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + K866Q; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E493A + K495N + G628W + S652D + Q690A; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + E819L; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + E819V; G180E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + D751N; G202M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N627H + G628W + T687K + E822A; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + K866I; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T783Q; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E493Y + K495N + A505C + G628W; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + T482A + K495N + G628W + D646N; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + A477G + K495N + G628W + S764F + S848N; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + I847T; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T685V + Y850Q; Y135M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S501R + G628W + T685V + T777N; y Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y850Q (en la que la posición de aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2).

35 En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 WT (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en:

40 Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; D47I + Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687K + A689I + Y715P; A109S + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; A109T + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687W + A689I + Y715P + S764F; D47I + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + S764F; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; D47I + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687C + A689I + Y715P; D47I + A109T + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687W + A689I + Y715P; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + S764F; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + S764F; D47I + A109T + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + S764F; D47I + A109T + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + S764F; D47I + A109T + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; A109T + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; A109T + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687C + A689I + Y715P; D47I + I106V + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314L + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + A732G; Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687W + A689I + Y715P; I106V + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314L + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + A732G; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314L + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; D47I + A109S + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687W + A689I + Y715P; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687W + A689I + Y715P; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314L + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; D47I + A109S + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687W + A689I + Y715P; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314L + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; I106V + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S652D + A689I + Y715P + A732G; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; I106V + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + S652D + A689I + Y715P + A732G; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R +

ES 2 455 269 T3

5 G628W + A689I + Y715P;1106V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N +
 G628W + A689I + Y715P; D47I + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L +
 K495N + S604A + G628W + A689I + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L +
 K495N + G628W + A689I + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N +
 10 G628W + A689I + Y715P;V25A + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N +
 G628W + A689I + Y715P; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + Q474I +
 A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + S764F; Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N +
 S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; D47I + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N +
 S434P + A475L + K495N + N588F + G628W + A689I + Y715P;S58G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R +
 15 Q381V + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P;V253F + Q258N + Q291W + Q313M +
 D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + T785L + M816L; A243G + Q258N +
 V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + S764F;
 I106V + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + N588F + G628W +
 S652D + A689I + Y715P + D733G; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N +
 20 G628W + A689I + Y715P + V846L; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N +
 S604A + G628W + A689I + Y715P; A79G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L +
 K495N + G628W + A689I + Y715P + T777N; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L +
 K495N + G628W + A689I + Y715P;V25A + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L +
 K495N + G628W + A689I + Y715P;K24T + A79E + Q258N + D274Y + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P
 25 + A475L + K495N + A505C + G628W + A689I + Y715P + T777N; D47I + Q258N + Q291W + Q313M + A343C +
 D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S604V + G628W + T687C + A689I + Y715P + S764F + L869R;
 Q258N + D274Y + Q291W + Q313M + D369R + E385L + E402N + S434P + A475L + K495N + G626D + G628W +
 A689I + Y715P + T777N;S58G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + Q381V + E402N + S434P + N437D +
 A475L + K495N + G628W + A689I + Q690H + D709E + E710G + Y715P; D47I+ Q258N + V260G + Q291W +
 30 Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + Q474I+ A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P; Q258N +
 Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + N437K + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + T785L;
 A109S + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S604I + G628W + A689I +
 Y715P; Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S604V + G628W +
 A689I + Y715P + K807R; Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N +
 35 S604V + G628W + A689I + Y715P; Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N +
 G628W + A689I + Y715P + L757K; D47I + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + K495N +
 N588F + G628W + S652D + A689I + Y715P; A79M + A136L + Q258N + D274Y + Q291W + Q313M + D369R +
 E402N + S434P + A475L + K495N + A505C + G628W + A689I + Y715P + T783A; D47I + A109T + Q258N + V260G
 + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + S604V + G628W + A689I + Y715P +
 40 S764F;S58G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I +
 Y715P + T785L;K24G + A136L + Q258N + D274Y + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L +
 K495N + A505C + G628W + A689I + Y715P + T777N; S58G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + Q381V +
 E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + T785L; y S58G + Q258N + Q291W + Q313M +
 D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + A689I + Y715P + T785L + M816L (en la que la posición de
 aminoácido se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2).

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β-glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente
 invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 WT (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y
 comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en:

45 D47I + Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687K +
 A689I + Y715P; D47I + A79G + Q85N + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P
 + A475L + K495N + G628W + T687K + A689I + Y715P + A732M; D47I + Q258N + V260G + Q291W + Q313M +
 50 F314L + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687C + A689I + Y715P + A732G; D47I
 + A79E + Q85N + Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A505C +
 G628W + T687W + A689I + Y715P; D47I+ A79E + Q85N + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314L + A343C +
 D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687K + A689I + Y715P; D47I + A79G + Q85N + Q258N +
 V260G + L275Y + Q291W + Q313M + F314V + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A505C +
 55 G628W + T687C + A689I + Y715P + S764Y + R769H; D47I+ A79G + Q85N + Q258N + V260G + Q291W + Q313M
 + F314V + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687K + A689I + Y715P; D47I + A79M
 + Q85N + Q258N + V260G + L275Y + Q291W + Q313M + F314L + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L +
 K495N + A505C + G628W + T687K + A689I + Y715P; D47I + A79M + Q85N + Q258N + Q291W + Q313M + A343C
 + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + A505C + G628W + T687C + A689I + Y715P + A732G; D47I +
 60 Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314V + A343C + D369R + E402N + S434P + K495N + A505C + G628W +
 T687C + A689I + Y715P + A732G; D47I + A79M + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314V + A343C + D369R
 + E402N + S434P + K495N + G628W + T687K + A689I + Y715P + A732G; D47I + Q258N + L275Y + Q291W +
 Q313M + F314V + A343C + D369R + E402N + S434P + K495N + G628W + T687K + A689I + Y715P + A732G; D47I
 + A79E + Q85N + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314V + A343C + D369R + E402N + S434P + K495N +
 A505C + G628W + T687W + A689I + Y715P + A732V; D47I + A79M + Q258N + V260G + Q291W + Q313M +
 65 A343C + D369R + E402N + S434P + K495N + A505C + G628W + T687K + A689I + Y715P + A732M; D47I + Q85N
 + Q258N + V260G + Q291W + Q313M + F314V + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W +

En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado de aquellos ejemplificados anteriormente (Tabla 2, 3, 4, 5, 6, 7) y comprende además sustituciones que (a) no disminuyen la actividad o termoestabilidad de la variante y (b) no incluyen sustituciones en ningún residuo adicional en el grupo que consiste en: K57; A88; 1106; N112; Q119; T120; A123; R132; Y135; A136; A141; K142; L149; G158; P161; P172; T177; 1179; G180; M181; S182; E183; K186; A197; G202; Y219; N220; S222; T224; 1229; M234; F242; A243; V246; Q258; D274; V286; Q291; Q313; V318; A343; T354; T357; D358; E360; D369; P374; I375; A378; Q381; E385; S388; V390; A394; N398; E402; K406; 1428; S434; N437; E449; Q474; A475; T482; S489; Y491; K530; N536; T540; T565; V674; R682; 1867; E868; y P870.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 6,0 a 6,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la Bgl1 C1 nativa, como se identifica en la Tabla 2. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 5,0 a 5,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la Bgl1 C1 nativa, como se identifica en la Tabla 2. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 4,0 a 4,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la Bgl1 C1 nativa, como se identifica en la Tabla 2. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 3,0 a 3,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la Bgl1 C1 nativa, como se identifica en la Tabla 2. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 2,0 a 2,9 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la Bgl1 C1 nativa, como se identifica en la Tabla 2. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 1,1 a 1,9 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la Bgl1 C1 nativa, como se identifica en la Tabla 2.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 6,0 a 6,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 3, como se identifica en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 5,0 a 5,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 3, como se identifica en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 4,0 a 4,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 3, como se identifica en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 3,0 a 3,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 3, como se identifica en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la variante un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 2,0 a 2,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 3, como se identifica en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 1,1 a 1,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 3, como se identifica en la Tabla 3.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 4,0 a 4,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 269, como se identifica en la Tabla 4. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 3,0 a 3,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 269, como se identifica en la Tabla 4. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 2,0 a 2,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 269, como se identifica en la Tabla 4. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 1,1 a 1,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 269 como se identifica en la Tabla 4.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 4,0 a 4,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 481, como se identifica en la Tabla 5. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 3,0 a 3,9 veces de mejora en la actividad con respecto a la variante 481, como se identifica en la Tabla 5. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 2,0 a 2,9 veces

variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 1,1 a 1,9 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 481, como se identifica en la Tabla 5. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 0,6 a 1,0 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 481, como se identifica en la Tabla 5.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 2,0 a 2,9 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 647, como se identifica en la Tabla 6. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 1,1 a 1,9 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 647, como se identifica en la Tabla 6. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 0,6 a 1,0 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 647, como se identifica en la Tabla 6. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 0,2 a 0,5 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 647, como se identifica en la Tabla 6.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 1,1 a 1,9 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 664, como se identifica en la Tabla 7. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran al menos 0,6 a 1,0 veces de mejora en la termoestabilidad con respecto a la variante 664, como se identifica en la Tabla 7.

En algunas realizaciones, la variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante de la presente invención es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a Bgl1 C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran cualquier mejora en la actividad y/o termoestabilidad con respecto a la Bgl1 C1 nativa, como se identifica en la Tabla 2. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran cualquier mejora en la actividad y/o termoestabilidad con respecto a la variante 3 como se identifica en la Tabla 3. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran cualquier mejora en la actividad y/o termoestabilidad con respecto a la variante 481 como se identifica en la Tabla 5. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran cualquier mejora en la actividad y/o termoestabilidad con respecto a la variante 647 como se identifica en la Tabla 6. En algunas realizaciones, la variante comprende un conjunto de sustitución seleccionado del grupo que consiste en conjuntos de sustitución que muestran cualquier mejora en la actividad y/o termoestabilidad con respecto a la variante 664 como se identifica en la Tabla 7.

Como se observa anteriormente, los polipéptidos de β -glucosidasa englobados por la invención tienen al menos aproximadamente el 70 % de identidad de secuencias con los residuos 20-870 de SEC ID N°: 2. En algunas realizaciones, los polipéptidos de β -glucosidasa englobados por la invención incluyen aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente el 71 % idéntica, al menos aproximadamente el 72 % idéntica, al menos aproximadamente el 73 % idéntica, al menos aproximadamente el 73 % idéntica, al menos aproximadamente el 74 % idéntica, al menos aproximadamente el 75 % idéntica, al menos aproximadamente el 76 % idéntica, al menos aproximadamente el 77 % idéntica, al menos aproximadamente el 78 % idéntica, al menos aproximadamente el 79 % idéntica, al menos aproximadamente el 80 % idéntica, al menos aproximadamente el 81 % idéntica, al menos aproximadamente el 82 % idéntica, al menos aproximadamente el 83 % idéntica, al menos aproximadamente el 84 % idéntica, al menos aproximadamente el 85 % idéntica, al menos aproximadamente el 86 % idéntica, al menos aproximadamente el 87 % idéntica, al menos aproximadamente el 88 % idéntica, al menos aproximadamente el 89 % idéntica, al menos aproximadamente el 90 % idéntica, al menos aproximadamente el 91 % idéntica, al menos aproximadamente el 92 % idéntica, al menos aproximadamente el 93 % idéntica, al menos aproximadamente el 94 % idéntica, al menos aproximadamente el 95 % idéntica, al menos aproximadamente el 96 % idéntica, al menos aproximadamente el 97 % idéntica, al menos aproximadamente el 98 % idéntica o al menos aproximadamente el 99 % idéntica a los residuos 20-870 de SEC ID N°: 2. Cada recitación en el presente documento de "70 %" debe entenderse que también incluye, provisionalmente, cualquiera de los mayores valores anteriores.

Como se observa anteriormente, las variantes de Bgl1 de la invención pueden englobar sustituciones de aminoácidos adicionales más allá de aquellas enumeradas anteriormente que incluyen, por ejemplo, variantes con

una o más sustituciones conservativas adicionales hechas en sus secuencias de aminoácidos. Ejemplos de sustituciones conservativas están dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina y histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparaginas), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina, prolina, cisteína y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en "The proteins", Academic Press, Nueva York, que se incorpora en el presente documento por referencia. Los intercambios que se producen más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, además de éstos a la inversa.

Variaciones conservativamente sustituidas de las variantes de polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención incluyen sustituciones de un pequeño porcentaje, normalmente inferior al 5 %, más normalmente inferior al 2 % y frecuentemente inferior al 1 % de los aminoácidos de la secuencia de polipéptidos, con un aminoácido conservativamente seleccionado del mismo grupo de sustitución conservativa. La adición de secuencias que no alteran la actividad codificada de una β -glucosidasa, tal como la adición de una secuencia no funcional o no codificante, se considera una variación conservativa del polinucleótido de β -glucosidasa.

La presente invención también proporciona fragmentos enzimáticamente activos de las variantes de polipéptido de β -glucosidasa descritas en el presente documento que tienen actividad de β -glucosidasa y al menos una sustitución descrita en el presente documento. Se cree basándose en estudios anteriores que C1 Bgl1 tolera la truncación (es decir, retiene actividad). Se ha observado que una variante de C1 Bgl1 que tiene una secuencia que se diferencia de la natural en cada una de las 25 posiciones de aminoácidos del extremo N retuvo actividad de β -glucosidasa (no mostrada). Similarmente, la truncación en los extremos carboxi de 16 residuos de aminoácidos es tolerada en β -glucosidasa de *Azospirillum irakense* (CelA). Véase USSN 61/218.020, que se incorpora en el presente documento por referencia. Por consiguiente, la presente invención proporciona además una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada o recombinante que tiene una secuencia de aminoácidos que tienen una delección de 1 a 50 residuos de aminoácidos del extremo carboxi (C-), el extremo amino (N-), o ambos (es decir, una delección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50 residuos de aminoácidos de cualquiera o ambos del extremo N o C) con respecto a SEC ID N°: 2. En ciertas realizaciones, la delección será de 1 a 15 residuos de aminoácidos del extremo N y/o de 1 a 40 residuos de aminoácidos del extremo C. Estos fragmentos de β -glucosidasa también se denominan en el presente documento variantes de polipéptido de β -glucosidasa truncadas en el extremo N y truncadas en el extremo C, respectivamente. En algunas realizaciones, la delección puede ser de 1 a 30, o 1 a 20, o 1 a 10 residuos, o 1 a 5 residuos desde el extremo C, el extremo N, o ambos.

TABLA 2

Tabla 2: Condiciones de termoactividad: pH 5, 65 °C durante 21 h. Condiciones de termoestabilidad: la actividad residual enzimática se determinó después de incubar a pH 5, 65 °C durante 6 h.

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³
1	M181Y+Q291W+E402N+S434P		+++++	++
2	R132K+L149M+Q313M+D369L+E385L+N437D		+++++	++
3	Q291W+D369L+E402N		+++++	+++
4	Y135I+Q258N+Q474I		+++++	+
5	M181Y+Q291W+E360D+D369V+P374Y+T482A		+++++	+++
6	Q258N+N437F+S489L+Y491H		+++++	++
7	Q119E+Q258N+T357L+Q474I+S489L		+++++	++
8	Q258N+D369R+S489L+Y491H		+++++	++
9	N220Y+Q258N+T357L+D369R+Q474I+Y491F	g1428a	+++++	++
10	M234E+V246L+D358K+D369L+N398G+K530M		+++++	++
11	Y135Q+I229M+F242L+D369L+K530M		++++	++
12	D369Q+P374Y+E402N+T540K		++++	++
13	Y135Q+P172A+I179M+I229M+Q291A+D358K+D369L+N398G		++++	++
14	R132K+D369L+E385L		++++	++
15	Y135M+I179M+Q291A+D358K+D369L	t573g	++++	++
16	Q291W+P374Y+E402N+S434P		++++	++
17	Q119E+N220Y+Q258N+T357L+S489L		++++	++

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	
5					
10	18	I179M+Q291A+D358K+D369L+I375V+S388W	c1068a+c1461t	++++	++
	19	Q291W+D369C	c2580t	++++	++
	20	R132K+T354Q+D369L+N437L		++++	+
	21	Q291A+D369L+N398G+K530M		++++	++
15	22	Q119E+Q258N+D274Y+S489L		++++	++
	23	Q119E+N220Y+Q258N+Q474I+S489L		++++	++
	24	M181Y+D369L		++++	+
	25	T120M+S222E+Q313M+T354Q+D369L+E385L		++++	++
20	26	A4G+Q258N+D274Y+T357L+N437W+Q474I+Y491H	c27t	++++	++
	27	R132G+D369L+N437D		++++	++
	28	S182L+Q313M+D369L+E385L		++++	++
	29	R132G+D369L+E385L		++++	++
	30	N112V+D358K+D369L+S388W+K530M		++++	++
25	31	I106V+G180E+D369L+Q381V		++++	++
	32	I179M+Q291A+D369L	c489t+c1284t	++++	++
	33	I179M+D358K+D369L+S388W		++++	++
	34	M234E+Q291A+D369L+N398G		++++	++
30	35	I179M+Q291A+D358K+D369L+Q381I		++++	++
	36	Y135Q+N220L+Q291A+D369L+N398G		++++	++
	37	Y135I+D369L		++++	+
	38	S182L+D369L+E385L+N437L		++++	++
35	39	T120Y+R132K+D369L+N437D		++++	++
	40	M234E+D369L+S388W+N398G+K530M	c1098t	++++	++
	41	Y135M+I179M+D369L+V390I+K530M	t573g	++++	++
	42	L149Q+A197V+Q313M+D369L	c852t+c1308t	++++	+
40	43	T120M+R132K+D369L+N437L		++++	++
	44	T120M+R132W+L149M+Q313M+T354Q+D369L+E385L+N437D	c540t	++++	++
	45	A4G+Y135I+N220Y+Q258N+T357P+N437Y		++++	+
45	46	D358K+D369L+S388W	t573g+c657t	++++	++
	47	Q258N+D274Y+N437F		++++	+
	48	D369L+S434P+T540K		++++	++
	49	G158D+I179M+Q291A+D358K+D369L+I375V+N398G+K530M		++++	++
50	50	Y135I+D274Y+D369R		++++	+
	51	Q258N+D369L+Q474I+S489L+Y491F		++++	++
	52	R132W+S182W+D369L+E385L		++++	++
	53	S182L+T354Q+D369L+E385L		++++	++
	54	S222Q+T354Q+D369L+E385L+N437D+T565G		++++	++
55	55	Y135M+P161S+Q291A+A343T+D369L+I375V+K406D	c1200a	++++	++
	56	Q291W+D369C+T540K	c855t	++++	++
	57	D369L+P374Y+E402N		++++	+
	58	Y135I+A343V+D369F+S489L		++++	+
60	59	M234E+D358K+D369L+S388W		++++	++
	60	T120M+L149Q+D369L+E385L		++++	++
	61	Q313M+D369L+E385L		+++	++
	62	T120Y+D369L+E385L	g750g	+++	++
	63	D369L+N437D+T565A		+++	+
65	64	N112V+Q291A+D369L+I375V	c1128t	+++	++

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	
5					
10	65	R132W+L149Q+Q313M+T354Q+D369L	c1305t	+++	+
	66	Y135M+D369L+I375V+N398G		+++	++
	67	D369L+E385L		+++	++
	68	T120M+S182L+Q313M+T354Q+D369L+E385L		+++	++
	69	T177I+Q291W+P374Y+T482A		+++	+
15	70	Q258N+N437F		+++	+
	71	T120V+R132W+D369L+T565G		+++	+
	72	N112V+Q291A+D358N+D369E+S388C+K406D		+++	+
	73	Q291A+D358K+D369L+S388W+K406D	t573g	+++	++
20	74	I106V+E360R+D369L+Q381V		+++	+
	75	M234E+Q291 A+D369L+S388W+N398G		+++	++
	76	L149M+Q313M+D369L		+++	++
	77	M234I+Q291W+E360D+D369V+T482A		+++	+++
	78	T120V+T354Q+D369L+E385L+T565P		+++	++
25	79	M234I+Q291W+E360D+S434P	t42n	+++	++
	80	D369Y+I867M+E868R		+++	+
	81	R132W+S182L+Q313M+D369L	c285t+c10 92t+c109 5t	+++	+
30	82	M234I+Q291W+P374Y+T482A		+++	++
	83	Y219V+M234I+D369C+P374Y+S434P		+++	++
	84	S182L+Q313M+D369L+E385L+N437L	c1044t	+++	++
	85	M234E+D358K+D369L+S388W+K530M		+++	++
	86	R132G+S222E+D369L+E385L	a51g	+++	++
35	87	R132K+L149M+S182L+D369L+N437L		+++	+
	88	T120H+Q313M+D369L		+++	++
	89	R132W+D369L	c1047t	+++	+
	90	D369L+P374Y		+++	++
40	91	N112V+N220L+Q291A+D369L+S388W+N398G		+++	++
	92	Q291A+D369L+I375V+K530G		+++	++
	93	R132K+L149M+S182L+T354Q+D369L+N437D+T 565G		+++	+
	94	T120H+S222E+Q313M+D369L+N437D+T565G		+++	++
45	95	A123N+Q291W+T482A+T540K		+++	++
	96	S222E+Q313M+T354Q+D369L+E385L		+++	++
	97	R132W+D369L+T565G		+++	+
	98	G202M+E360A+D369I+A394L		+++	*
	99	R132G+S222Q+Q313M+D369L		+++	++
50	100	R132W+L149M+D369L		+++	+
	101	L149M+Q313M+T354Q+D369L		+++	+
	102	Q119L+G202M+D369L		+++	+
	103	M181Y+M234I+D369C		+++	+
	104	I179M+N220L+Q291A+D369L+I375V		+++	++
55	105	S222E+Q313M+D369L+E385L+N437L		+++	++
	106	I179M+M234E+D358K+D369L+S388W+N398G		+++	++
	107	A123N+Y219V+Q291W+E360D+P374Y+S434P		+++	++
	108	D369L+E402N	c1092t	+++	+
	109	D369L		+++	++
60	110	Y219V+M234I+Q291W+T482A		+++	+
	111	Q291W+E360D+S434P		+++	++
	112	D369L+S434P		+++	++
	113	G180E+E360R+D369L		+++	++
	114	A123N+M181Y+Q291W+D369K+S434P+T540K		+++	++++
65	115	Q119E+T357L+D369M+S489L		+++	+

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	
5					
10	116	Q119E+D369F+Y491H		+++	+
	117	Q119L+D369L		+++	+
	118	Q119E+N220Y+V286I+S489L	c1749t+g2 280t	+++	+
15	119	Q291A+D369L+Q381I		+++	++
	120	A475F		+++	**
	121	D369L+N536K		+++	++
	122	Q119E+Y135I+D369H		+++	+
	123	Q258N+S489L		+++	+
20	124	Q119E+Y135I+N437Y		+++	**
	125	Q119E+Y135I+N437F+Y491F		+++	+
	126	Q119L+D369L+A394V		+++	+
	127	E183G+E360A+D369L+I428V		+++	+
	128	D369L+E449Q+N536K		+++	+
25	129	Q119L+G202M+E360A+A475F		+++	**
	130	I106V+D369L		+++	++
	131	Y135I+D369M		+++	+
	132	M234I+D369C+S434P		+++	+
	133	D369L+A475Y		+++	++
30	134	Q119E+Y135I+S489L		+++	+
	135	D369Y+N536K		+++	+
	136	E360R+D369L		+++	+
	137	G202V+A475H		+++	+
	138	D369L+Q381V+N536K		+++	++
35	139	N220Y+Q258N+S489L+Y491F		+++	+
	140	Q258N+T357L+D369M		+++	++
	141	I179M+Q291A+D369L+Q381L+S388W+N398G	a69g	+++	+
	142	D369Y+A394G+N536K		+++	++
	143	Q291W+E360D+D369V+P374Y		++	+++
40	144	T120M+L149Q+T354Q+D369L+E385L		++	++
	145	S489L+Y491H		++	+
	146	N220S+Q291F+D369L		++	++
	147	D369C+S434P+T540K		++	+
	148	V318E+D369L+I428V		++	+
45	149	E183M+G202M+E360A+D369L+A378K+A394V		++	**
	150	A394G+N536K		++	+
	151	Q291 W+T540K		++	+
	152	N220L+Q291A+D369L+Q381L+S388W+K530M		++	+
50	153	T120V+R132W+E385L+N437D		++	+
	154	Q119L+E360A+D369L+A378K		++	+
	155	D369A+N536K	t726c	++	+
	156	G202V+D369L+A475H		++	+
	157	Q381V+A475Y+N536K		++	+
55	158	S434P		++	+
	159	I106V+G180E+D369Y+A394G		++	++
	160	G180E+Q381V+A475H		++	+
	161	Q119E+N220Y+Q474I		++	+
	162	I106V+D369Q		++	+
60	163	A475Y+N536K		++	+
	164	K142R+Y219V+Q291W+S434P+V674I	c1398t	++	++
	165	L149Q+S182L+Q313M+D369L+N437L		++	+
	166	N112V+I179M+M234E+D369L+N398G	c1188t	++	++

65

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	
5	167	E360A+D369L+A378K		++	+
	168	E360R+D369Y+N536K		++	+
	169	E360R+D369A+Q381V+N536K		++	+
	170	D369L+Q381D	c858t	++	+
10	171	N437F+S489L		++	+
	172	E183M+G202M+V318E+D369I+A394L+I428V		++	**
	173	E360D+D369L+E402N+S434P		++	+
	174	Q119L+A141F+G202M+A394L+I428V+A475F	c2488t	++	*
15	175	T357L+D369R+S489L+Y491H		++	+
	176	Y135I+Q258N+T357L		++	+
	177	K142R+Q291W+E360D+D369C+E402N		++	++
	178	E183M+A243V+D369L+A378K+A475F		++	+
	179	R132K+L149M+E385L		++	+
20	180	D369Y	a1266t	++	+
	181	M234I+E402N+S434P		++	**
	182	N437Y	c1641t	++	**
	183	Q119E+N437F		++	+
	184	N536K		++	+
25	185	Q119L+E183Q+G202M+D369P		++	+
	186	N112V+I179M+Q291A+D358K+K406D	g1122a	++	+
	187	A123N+Q291W+T540K		++	+
	188	D369I+A394L+I428V	t2364n	++	*
	189	A88S+N536K		++	+
30	190	Q119E+Y135I+N437F	c1473t	++	*
	191	A141F+G202M+E360A+D369P+A378K		++	*
	192	A123N+T482A		++	**
	193	Q313M+N437D		++	+
	194	E360R+D369Y		++	+
35	195	E183M+G202M+A475F		++	**
	196	Q119L+E360A+A394V+A475F	t2364g	++	**
	197	D369L+A378K		++	+
	198	E360R+D369L+A394G	c90a	++	+
40	199	M181Y+D369E+S434P		++	+
	200	D369I	t2364n	++	+
	201	N112V+Y135Q+I375V+K406D+K530M+P870S		++	+
	202	Q119E+Y135I+N220Y+Q258N		++	+
	203	D369P+A394V+I428V		++	+
45	204	V318E+D369L		++	+
	205	K186R+N536K		++	+
	206	Q119L+D369L+A378K		++	+
	207	M234I+D369K+S434P		+	+
	208	N112V+I179M+N220L+Q291A+Q381I+S388W+N398G		+	+
50	209	E402N+S434P		+	+
	210	Q119L+A141F+G202M+A394Q	c993t	+	*
	211	Q313M+T354Q+N437D		+	+
55	212	N112V+M234E+D369L+I375V+K406D	g1437a	+	++
	213	Q119E+A136E+N220Y		+	**
	214	Q381D+A394G+N536K		+	**
60	215	Q119L+E183G+D369Q+A378T+V390I		+	**

65

(continúa)

	Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre WT (SEQ ID NO: 2) ³
5					
10					
15					
20					
25					
30					
35					
40					
45					
50					
55					
60					
65					
	216	Y135I+T357L+Q474I+S489L+Y491F		+	+
	217	D369E+A394P+I428V		+	+
	218	N112V+Q291A+Q381I+N398G		+	+
	219	E360R+N536K		+	+
	220	E360D+D369C		+	+
	221	R132W+S182L+E385L		+	**
	222	I179M+Q291A+D358K+N398G+K530G		+	+
	223	N220Y+Q258N+T357L		+	+
	224	T224N+D274Y+T357L+N437F		+	+
	225	N437D		+	+
	226	M234I+E360D+T482A		+	+
	227	A141F+G202M+D274N+V318E+E360A+I428V		+	*
	228	D369Q		+	+
	229	N112V+N220L+D358K+D369L+I375V+Q381I+N398G		+	+
	230	Y135I+D369F		+	+
	231	A243V+V318E+E360A+A475W		+	**
	232	N220L+D369L+Q381L+S388W+N398G+K530G		+	+
	233	S489L		+	+
	234	K142R+Y219V		+	*
	235	Y135I+N220Y+Y491F		+	*
	236	S182W+T354Q+E385L		+	+
	237	I179M+D358K+S388W		+	**
	238	L149M+Q313M+T565P		+	**
	239	R132G+E385L		+	**
	240	V318E		+	+
	241	Q119L+E183K		+	**
	242	R132W+E385L		+	**
	243	E183G+V318E+E360A+A394Q+A475C		+	**
	244	E183M+G202M+E360A		+	**
	245	A394G		+	+
	246	D369P		+	+
	247	Y135M+Q291A+S388W+N398G		+	*
	248	Y219V+D369C		+	++
	249	A394V+I428V	g1428a	+	**
	250	Q119L		+	+
	251	Y135I		+	**
	252	E360R+D369Q+Q381D+N536K		+	**
	253	N220L+M234E+Q291A+I375V+K530M		+	+
	254	Q119L+G202M+E360A		+	**
	255	N220Y+Q258N+D369R		+	+++
	256	M181Y+M234I+Q291W+E402N		+	+
	257	A394V	g2382a	+	**
	258	T120M+L149Q+Q313M	c1686t	+	+
	259	Q119L+V318E+I428V		+	+
	260	E360R+Q381V		+	+
	261	K57R+G202M+E360A+A394V		+	**
	262	I179M+D358K+I375V+Q381L		+	+
	263	E360A		+	+
	264	I179M+R682W		+	+
	265	E360A+I428V		+	+
	266	D369K+P374Y		+	+

(continúa)

¹ Los cambios en aminoácidos son indicados con respecto a SEQ ID NO:2.
² Los cambios en nucleótidos son indicados con respecto a SEQ ID NO:1.
³ La mejora está representada de la siguiente manera:
 * = 0.3 a 0.5 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)
 ** = 0.6 a 1 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)
 + = 1.1 a 1.9 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)
 ++ = 2.0 a 2.9 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)
 +++ = 3.0 a 3.9 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)
 ++++ = 4.0 a 4.9 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)
 +++++ = 5.0 a 5.9 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)
 ++++++ = 6.0 a 6.9 veces mejora con respecto a los nativos C1 Bgl1 (SEQ ID NO:2)

TABLA 3 Tabla 3: Condiciones de termoactividad: pH 5, 70 °C durante 21 h. Condiciones de termoestabilidad: la actividad residual enzimática se determinó después de incubar a pH 5, 65 °C durante 16-48 h.

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³
3	Q291W + D369L + E402N			
267	I106V+Q258N+Q291W+D369L+E402N+S434P			
268	I106V+Y135Q+Q258N+Q291W+Q313M+D369H+E402N+K495N+G628 W	t1620a		
269	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628 W			
270	I106V+Q258N+Q291W+Q313M+D369H+E402N+S434P+A475C+K495I+T540K+G628W			
271	I106V+Q258N+Q291W+D369R+E402N+S434P+K495H+G628L			
272	D274Y+Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N4371+S489N	g357a		
273	Q258N+Q291W+Q313M+D369H+E402N+S434P+T540K	c405t+t188 4g		
274	I106V+Q258N+Q291W+D369L+E402N+S434P+A475F+K495H+G628V	t1620a		
275	Q258N+Q291W+Q313M+D369L+E402N+S434P+A475C+K495I+G628 W	t60c+c246t +c318t +c405t+t16 20a		
276	I106V+Y135Q+M181Y+Q258N+Q291W+Q313M+D369L+E402N+S434P+K495N	t1620a+t18 84g		
277	Y135Q+Q258N+Q291W+D369L+E402N+K495N	t1620a+t18 84g		
278	Q119E+D274Y+Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N437V+S489N+S614A	t846c		
279	Y135Q+Q258N+Q291W+Q313M+D369L+E402N+S434P+A475F+K495N+G628V	c318t+c98 4a+ t1620a		
280	R132H+Q258N+Q291W+D369Y+E402N+K495Q	c318t+c40 5t+ t1620a		
281	Y135Q+Q258N+Q291W+D369L+E402N+S434P+A475F+K495H			
282	Y135Q+Q258N+Q291W+D369R+E402N+S434P+K495I+G628V	t1620a		
283	I106V+M181Y+Q258N+Q291W+D369L+E402N			
284	I106V+Q258N+Q291W+D369H+E402N+S434P+A475F+K495F+G628V	c405t+t162 0a		
285	Q258N+Q291W+Q313M+D369L+E402N+S434P+G628V			
286	Q258N+Q291W+D369L+E402N+A475F+K495I	t1620a+t18 84g+c2463 t		

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³	
5	287	Q119E+D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437I	+++	+	
10	288	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L	c318t+c405t	+++	++
	289	Q258N+Q291W+D369Y+E402N+S434P+K495H+G628W	t1620a	+++	+
15	290	D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437I+S489N+K530C	g357a+a1840t	+++	+
	291	I106V+Y135Q+Q258N+Q291W+Q313M+D369Y+E402N+S434P+A475F+K495H+T540K	t1884g	+++	+++
	292	Q119E+Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N	c822t	+++	+
20	293	I106V+M181Y+Q258N+Q291W+Q313M+D369H+E402N+S434P+A475L+K495Q+G628V	c405t+c1581t+t1620a	+++	++
	294	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437D		+++	+
25	295	Q258N+Q291W+D369R+E402N+S434P+G628V		+++	+
	296	Q258N+Q291W+Q313M+D369H+E402N+S434P+G628L	t1620a	+++	++
	297	Q258N+Q291W+D369L+E402N	c318t	+++	+
	298	D274Y+Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N437F+S614D	g357a+t1465a	+++	+
30	299	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437L+K530V	a1840t	+++	+
	300	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437V+S489L+K530N	a1840t	+++	++
35	301	Q258N+Q291W+D369L+E402N+S434P+A475F+K495F+T540K	c318t+c405t+t1884g	+++	+
	302	M181Y+Q291W+Q313M+D369Y+E402N	c318t+c405t	+++	+
40	303	A243V+D274Y+Q291W+D358K+D369L+E402N+N437I+K530C	g357a+t1465a+a1840t	+++	+
	304	Q119E+D274Y+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437V+K530V+S614A	t1465a	++	**
45	305	Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N437W+K530C+S614A	g357a+c822t	++	+
	306	Q119E+D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437W		++	++
	307	D274Y+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437I+K530N+S614V	g357a+t1465a	++	+
50	308	M181Y+Q258N+Q291W+Q313M+D369L+E402N+S434P	c318t+c405t	++	+++
	309	A109T+Q291W+D369L+E402N		++	+
	310	Q119E+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437Y+S489I+K530N	c822t+a1840t	++	++
55	311	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437D	a1840t	++	+
	312	D274Y+Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N437W+K530V+S614D	g357a+t1465a	++	+
60	313	Q258N+Q291W+D369R+E402N+A475W+K495H+G628V	t1620a	++	+
	314	A109S+Q291W+D369L+E402N	c1119t	++	+
	315	Q119E+D274Y+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437L+S614A	c1329t+t1465a	++	+
65	316	Q291W+D369L+E402N+E493Y+N504Y+T611A	c1563t+g1590a	++	+
	317	Q119E+D274Y+Q291W+D358K+D369L+E402N+S614V		++	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

	Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³
5	318	D274Y+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437L+K530N+S614A	g357a+t1465a	++	+
10	319	Q258H+Q291W+Q313M+D369R+E402N+A475F+K495N+G628L	1620a	++	+
	320	Q258N+Q291W+Q313M+D369Y+E402N+A475W+K495V+T540K+G628W		++	++
15	321	D274Y+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437W+S614V	g357a+c936a	++	+
	322	I106V+Y135Q+Q291W+Q313M+D369L+E402N+A475L+K495Q	t1620a+t1884g	++	++
	323	Q258N+Q291W+D369R+E402N+S434P+A475F+G628V		++	+
20	324	Q119E+D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437V	t1465a	++	+
	325	D274Y+Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N437Y+S489L+K530V	g357a	++	+
25	326	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E402N	a1840t	++	+
	327	Q291W+D369L+E402N+K495V+S501R+A503E+K530N+T611H	t1465a	++	+
	328	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437V+S489I+K530C		++	+
30	329	Q119E+Q291W+D358K+D369L+E402N+N437L+S489N	c822t	++	+
	330	D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437W+K530C+S614D	g357a	++	+
35	331	Q258N+Q291W+D369R+E402N+A475F+K495N+T540K+G628V	c318t+c405t	++	+
	332	Q291W+D369L+E402N+E493V+N504Y	c1563t+t1698c+c1773t+t1872c+c1905t	++	+
40	333	Q291W+D358E+D369L+E385*+E402N+S489T	g357a+c822t	++	+
	334	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+A475L+K495V+A601T+G628W		++	++
45	335	D274Y+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+S489N+S614C	g357a	++	+
	336	D274Y+Q291W+D358K+D369L+E402N+N437V+S489L+K530C+S614A	g357a+g1140a	++	+
50	337	Q119E+D274Y+Q291W+D358E+D369L+E402N+N437D	a1840t	++	+
	338	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437L+S614R	t1465a	++	+
55	339	D274Y+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437Y+K530V	g357a+t1465a+a1840t	++	**
	340	D274Y+Q291W+D358E+D369L+E402N+N437Y+S489N+K530N+S614V+D781N	g357a	++	+
60	341	Q258H+Q291W+D369*+E402N+S434P+T540K+G628L	c318t+c405t	++	+
	342	Q119E+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437L+S489N+K530V	c822t	++	+
	343	Q258N+Q291W+D369L+E402N+G628V	c405t+c1179t	++	+
65	344	Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+S489I+K530N	g357a+c822t+a1840t	++	+
	345	Q119E+Q291W+D369L+E385L+E402N+S489N+K530V+S614A	g6a+c822t	++	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

	Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³
5	346	I106V+Y135Q+Q291W+D369L+E402N+S434P+A475F+K495H+G628L	t1620a	++	+
10	347	Q119E+Q291W+D358K+D369L+E402N+N437V+K497R+S614A	c822t+t1465a	++	+
	348	Q119E+D274Y+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437L	t1465a	++	+
15	349	D274Y+Q291W+D358K+D369L+E402N+N437L+S489I+K530V+S614A	q357a	++	+
	350	I106V+Q291W+Q313M+D369L+E402N+S434P+A475W+K495N+G628 W	c405t+t1620a	++	++
20	351	Q291W+D369L+E402N+A505C+L620M+T635I	g1479a+t1512c+c1563t+t1698c+c1773t+t1872c	++	+
25	352	Q291W+D369L+E402N+E493A+N504Y+A505C+L620M+T635A	c1563t+t1698c+c1773t+t1872c	++	+
	353	D274Y+Q291W+D358N+D369L+E402N+S489N+K530C+S614A	g357a+c981t	++	+
30	354	D274Y+Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N437W+K530D	g357a+t1465a+a1840t	++	+
	355	Q291W+D369L+E402N+S489N+K495H+S501R+K530N	c1509g+c1833g	++	+
35	356	D274Y+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437D+K530C+S614 H	g357a	++	+
	357	Q119E+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437W+S489N+K530E+S614A	c822t	++	+
40	358	Q119E+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437W+S489N+K530E+S614A	t1698c+t1872c	++	+
	359	Q291W+D358K+D369L+E385L+E402N+N437I+K530M+S614L	g357a+c822t+ t1465a	+	**
	360	Q291W+D369L+E402N+R672I		+	**
45	361	D274Y+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437L+S489L	g357a+a1840t	+	+
	362	A265S+Q291W+D369L+E402N		+	**
	363	Q215M+Q291W+D369L+E402N		+	+
	364	Q291W+D369L+E402N+E493V+N504Y+N521C+T591A+L620M+T635I	t1872c	+	+
50	365	Q119E+D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437L+S489N+K530M+S614D		+	+
	366	Q119E+Q291W+D369L+E385L+E402N	c822t	+	+
55	367	Q291W+D369L+E402N+E493A+N504Y+D566G+R612P+L620M+T635 A	c1563t+c1773t+c1863t+t1872c+c2403a	+	+
	368	Q119E+D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+S614Y		+	+
60	369	106V+Y135Q+M181Y+Q258N+Q291W+D369L+E402N		+	++
	370	Q119E+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437W+K530V	c822t	+	+
65	371	Q215E+Q291W+D369L+E402N		+	**
	372	Q291W+D369L+E402N+N504Y+N521C+T591A+R612H+L620M+T635I	g1479a+t1698c+	+	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³	
5	373	Q119E+D274Y+Q291W+D358K+D369L+E402N+N437Y+K530I	t1465a+a1840t	+	**
10	374	Q258H+Q291W+D369L+E402N+K495N	c318t+t1620a+ t1884g	+	+
	375	Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437D+S489N+K530I	g357a+c822t+ a1840t	+	+
15	376	Q291W+D369L+P374Y+E402N+Y491L+S501R	c360t+c1773g	+	+
	377	Q258N+Q291W+Q313M+G332D+D369H+E402N+S434P		+	++
	378	Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437F+S489L+K530V	c822t+a1840t	+	+
20	379	Q291W+D369L+E402N+R672S		+	**
	380	Q291W+D369L+E402N+T687M		+	+
	381	Q291W+F314V+D369L+E402N		+	+
	382	Q258N+Q291W+T357A+D369H+E402N+S434P+K495F	t1620a+t1884g	+	+
25	383	Q291W+D369L+P374Y+E402N+Y491 F+S501R+N521C	c360t+c540a	+	+
	384	Q291W+D369L+E402N+Q690K		+	+
	385	Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437F+K530V+S614A	g357a+c822t+ t1465a	+	+
30	386	Q291W+D369L+E402N+R672A		+	**
	387	Q291W+D369L+E402N+R672T		+	**
	388	Q291W+D369L+E402N+D703K	c1947t	+	**
	389	D274Y+Q291W+D369L+E402N	c1305t+t1465a+a1840t	+	+
35	390	Q291W+D369L+E402N+R672F		+	+
	391	Q291W+D369L+E402N+R672D		+	**
	392	Q291W+D369L+E402N+Y491F+S501R+N536K+D566G	c1773g	+	+
40	393	Q291W+D369L+E402N+A732G		+	+
	394	Q291W+D369L+E402N+E493Y+N504Y+N521C+T591C+R612P+L620 M	t1698c+t1872c+c1905t	+	+
45	395	I106V+Y135Q+Q291W+D369L+E402N+A475F+G628W		+	+
	396	Q291W+D369L+E402N+R672G		+	**
	397	Q291W+D369L+E402N+T777N	c2328t	+	+
50	398	Q291W+Q313M+D369L+E402N+T540K	c318t+c405t	+	+
	399	Q291W+D369L+E402N+K708F		+	+
	400	Q291W+D369L+P374Y+E402N+S501H		+	**
	401	Q291W+D369L+E402N+Y715P	c2241t	+	+
	402	Q291W+D369L+E402N+A732M		+	+
55	403	Q291W+D369L+E402N+E493A+N504Y+N521C+D566G+R612P+L620 M	c1773t+t1872c+c1905t	+	+
	404	Q291W+D369L+E402N+Q690R		+	+
60	405	D274Y+Q291W+D369L+E385L+E402N+N437V+K530I+S614D	t1465a	+	**
	406	Q291W+D369L+E402N+L757K	c2454t	+	+
	407	Q291W+D369L+E402N+T687Y		+	+
	408	Q291W+D369L+E402N+Y491H+S501R+N521C+T591A		+	+
65	409	Q291W+D369L+E402N+V775C		+	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³	
5	409	Q291W+D369L+E402N+V775C		+	+
	410	Q291W+D369L+E402N+R672V		+	**
10	411	Q291W+D369L+E402N+N670D		+	**
	412	Q291W+D369L+E402N+T779S		+	**
	413	Q291W+D369L+E402N+V638R		+	**
	414	Q291W+D369L+E402N+T687F		+	+
	415	Q291W+D369L+E402N+T687L		+	**
15	416	Q291W+D369L+E402N+K610S		+	**
	417	Q291W+D369L+E402N+Y491L+S501R+N521C	c1773g	+	+
	418	D274Y+Q291W+D358E+D369L+E402N+K530V+S614V	g357a	+	**
20	419	1106V+M181Y+Q258N+Q291W+D369R+E402N+S434P+A475W+K495V+T540K+G628V	c405t	+	++
	420	Q291W+D369L+E402N+N536K	t1501a+c1773g	+	+
25	421	Q291W+D369L+E402N+E493V+N504Y+R612P+L620M	c1563t+t1698c+c1773t+t1872c+c1905t	+	+
	422	Q291W+D369L+E402N+S676C		+	**
30	423	Q291 W+D369L+E402N+T540K+G628W	c318t	+	**
	424	Q291W+D369L+E385L+E402N+N437D+S489L+K530C+S614D	g357a+c822t	+	+
	425	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437F+S489N+S614 L		+	+
35	426	Q291W+D369L+E402N+S434P+A475W+K495V	t1620a	+	+
	427	Q291W+D369L+E402N+A689I		+	+
	428	Q291W+D369L+E402N+E493A+N504Y+N521C+D566G+R612H+L620 M	c1773t+t1872c+c1905t	+	+
40	429	Q291W+D369L+E402N+V638S		+	**
	430	Q291W+D369L+E402N+V648W		+	**
	431	Q291W+D369L+E402N+D650V		+	**
	432	Q291W+D369L+E402N+V674M		+	**
	433	Q291W+D369L+E402N+V638E		+	**
45	434	106V+Q291W+D369L+E402N	t1884g	+	+
	435	Y135Q+Q291W+D369L+E402N	t1884g	+	**
	436	Q291W+D369L+E402N+S764F		+	+
50	437	Q291W+D369L+E402N+E493A+N504Y+A505C+N521C+T591A+R612P	t1698c+t1872c+c1905t	+	+
	438	Q291W+D369L+E402N+S489N+K495Q+S501R+K530N+T611Q	c1509g	+	+
	439	Q291W+D369L+E402N+T685V		+	+
55	440	I106V+Q291W+D369L+E402N+S434P+A475C+K495N+T540K		+	+
	441	Q119E+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437D+K530N+S614V	c822t	+	+
	442	Q291W+D369L+E402N+T687K		+	+
60	443	Q291W+D369L+E402N+S652D		+	+
	444	Q291W+D369R+E402N+A475F+K495Q+T540K+G628L		+	+
	445	Y135Q+Q291W+D369L+E402N+G628V	c318t	+	**
65	446	Q291W+D369L+E402N+E493Y+A505C+N521C+T591A+L620M	t1512c+t1698c+t1872c+c1905t	+	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³
5	447	Q291W+D369L+E402N+T687W	+	+
	448	Q291W+D369L+E402N+D650F	+	**
10	449	Q291W+D369L+E402N+T687C	+	+
	450	Q291W+D369L+E402N+S434P+K495N+G628V	+	**
	451	Q291W+D369L+E402N+S501N	c540a+c1773g	+
15	452	D274Y+Q291W+D369L+E402N+N437K+S489I+K530V+S614L	g357a	+
	453	Q291W+D369L+E402N+T699L	+	+
	454	Q119E+V2461+Q291W+D358E+D369L+E402N+S614L	c267t	+
20	455	Q291W+D369L+E402N+N504Y+N521C+D566G+L620M+T635A	g1479a+c1773t+t1872c	**
	456	Q291W+D369L+E402N+E493Y+N504Y+D566G+T591A+R612P+L620 M	c1563t+t1872c+c1905t	**
25	457	Q291W+D369L+E402N+N536K+T591A	**	+
	458	Q291W+D369L+E402N+Q690A	**	+
	459	Q291W+D358K+D369L+E402N+N437L+S489I+K530D	g357a+c822t+c1458t+a1840t	**
30	460	Q119E+D274Y+Q291W+D358E+D369L+E385L+E402N+N437V+S489N+K530M+S614H	**	+
	461	Q291W+D369L+P374Y+E402N+Y491L	**	**
	462	Q291 W+D369L+E402N+S501R	c1773g+	**
35	463	Q291W+D369L+E402N+Y491L+N521C+N536K	c360t+c540a+t1501a+c1773g	**
	464	Q291W+D369L+E402N+E493Y+N504Y+N521C+T591C+R612P+L620M+T635V	t1698c+t1872c	**
40	465	Q119E+Q291W+D358N+D369L+E385L+E402N+N437I+S489I+S614L	c822t	**
	466	T120Y+Q291W+D369L+E402N+S501R+N521C+D566G	c1773g	**
	467	Q291W+D369L+E402N+Y491L+N521C	t1501a	**
45	468	Q291W+D369L+E402N+Y491L+S501N+D566G+T591A	**	**
	469	D274Y+N278Y+Q291W+D358E+D369L+E402N+N437Y+S489L+K530E	g357a	**
50	470	I106V+Q291W+D369L+E402N+S434P+A475W+K495F+T540K+G628V	c405t+a636g	**
	471	Q119E+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437Y+E742G	c822t	**
	472	Y135Q+Q291W+D369Y+E402N+A475F+K495F	t1620a+t1884g	**
55	473	T120H+Q291W+D369L+E402N+Y491H+S501H+T591C	*	+
	474	Q119E+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437F+S489N+K530E+S614L	c822t	*
	475	Q119E+D274Y+Q291W+D358N+D369L+E402N+N437I+S489N+K530V+S614Y	*	+
60	476	T120Y+Q291W+D369L+E402N+N521C+N536K	c540a+c1773g	*
	477	Q291W+D369L+E402N+Y491F+S501N+N521C+N536K+T591R	c360t	*
65	478	Q291W+D369L+E402N+S501N+N521C+D566G+T591R	c1473t	*

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre Var ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre Var ³
479	Q291W+D369L+E402N+Y491L+S501R+N536K+D566G+T591R		*	+
480	D274Y+Q291W+D358E+D369L+E402N+N437Y+S489N+K5301+S614L	g357a	*	**
<p>1 Los cambios en aminoácidos son indicados con respecto a SEQ ID NO:2; La secuencia del esqueleto contiene sustituciones Q291W + D369L + E402N</p> <p>2 Los cambios en nucleótidos son indicados con respecto a SEQ ID NO:1.</p> <p>3 La mejora está representada de la siguiente manera: * = 0.3 a 0.5 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5) ** = 0.6 a 1 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5) + = 1.1 a 1.9 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5) ++ = 2.0 a 2.9 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5) +++ = 3.0 a 3.9 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5) ++++ = 4.0 a 4.9 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5) +++++ = 5.0 a 5.9 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5) ++++++ = 6.0 a 6.9 veces la mejora sobre la Variante 3 (SEQ ID NO:5)</p>				

TABLA 4

Tabla 4: Condiciones de termoactividad: pH 4,5, 70 °C durante 21 h. Condiciones de termoestabilidad: la actividad residual enzimática se determinó después de incubar a pH 4,5, 70 °C durante 2 h.

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³
269	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W			
481	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + A689I + Y715P		++++	++
482	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + Y715P + T823K	g1290a+g2160a	+++	+
483	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T685V + Y715P +		++	+
484	I106V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + S764F		++	+
485	A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + I428V + S434P+ A475L + K495N + G628W		++	+
486	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + Y491F+ K495N + G628W + Y715P		++	+
487	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + Q381V + E402N + S434P + A475L+ K495N + S501 R + G628W + Y715P		++	+
488	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S764F		++	+
489	Q258N + Q291 W + Q313M + D369R + E385L + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		++	+
490	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ N627H + G628W + A732G		++	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³
5 491	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + A6891		++	+
10 492	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T685V + Y715P + T777N		++	**
15 493	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + D650Y + Q716R + L757K		++	+
494	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + Y715P		++	++
495	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ V562L + G628W	c729t	++	+
20 496	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ A505C + G628W + S764F		++	+
497	Q258N + V260G + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		++	+
25 498	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + Y715P + E819V		++	+
499	A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		++	+
30 500	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S652D + V846F	c27t	++	+
501	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + Q690K		+	+
35 502	D471 + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	++
503	Q258N + Q291W + Q313M + A343C + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
40 504	E21Q + V175A + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P+ A475L + K495N + G628W	c249t	+	**
505	Q258N + Q291W + Q313M + E360D + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + L757K		+	**
45 506	Q258N + Q291W + Q313M + F314L + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + S6041 + N627H + G628W + A732G		+	+
507	A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + V775C		+	+
508	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S764F		+	+
509	P29Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
55 510	A136L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + S764F + P870S		+	+
511	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E385L + E402N + S434P + K495N+ G628W	c1425g	+	+
60 512	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T687M	g2160a	+	+
513	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ N588F + G628W		+	**
65 514	Q258N + Q291W + Q313M + D358K + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W	c951a	+	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³
515	Y135M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + Y715P	t1341c	+	+
516	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T785L		+	**
517	A79G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
518	A109T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + S848N		+	+
519	I106V + Q258N + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P+ A475L + K495N + G628W		+	+
520	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + A732G		+	+
521	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + L757K		+	+
522	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ N627H + G628W + T687M + E822K		+	+
523	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G616D + G628W		+	+
524	A79M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
525	I106V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
526	Q258N + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + A617V + G628W		+	**
527	Q258N + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
528	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + P436Q + A475L+ K495N + G626D + G628W		+	+
529	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T687C		+	+
530	Q85N + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
531	A109S + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + N536K + G628W		+	+
532	S58G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
533	E21Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + Q381V + E402N + S434P+ A475L + K495N + G628W		+	**
534	Q258N + L275Y + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
535	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ A505C + G628W		+	**
536	E21 R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
537	V25A + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
538	H26R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
539	L30K + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	*

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³
5	540	N45H + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	**
10	541	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E493V+ K495N + G628W	+	**
	542	P29R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	*
15	543	P29M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + A732S + A748T + V840I	c21t+c191 1t	+
	544	Q55R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	**
20	545	K24G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	+
	546	G180E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	**
	547	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + K495N + G628W	c1425g	+
25	548	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + Q479R+ K495N + S501 R + G628W + Y715P + E819L	+	+
	549	A79E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	+
30	550	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + R672G	+	**
	551	Q258N + Q291W + Q313M + F314V + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + A505C + G628W	g2493a	+
35	552	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T687K	+	+
	553	Q27R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	c1689g	+
40	554	V253F + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	+
	555	S22L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	**
	556	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + Q690H	a321t	+
45	557	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S799N	+	**
	558	Q258N + Q291W + Q313M + F314V + E360D + D369R + E402N + S434P+ A475L + K495N + G628W	+	+
50	559	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + E822M	+	+
	560	K24T + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	+
55	563	S22L + Q258N + Q291 W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ Q479R + K495N + G628W	+	+
	561	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S787G	+	+
60	562	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ R612H + G628W + L757K + S787G	+	*
65	564	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + T687K + E822M	+	**

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³	
5	565	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + M454E + A475L+ K495N + G628W	+	**	
10	566	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ V562C + G628W	+	**	
	567	S22R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	+	**	
15	568	V25G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	c2478t	+	**
	569	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T685V	c1842t	+	**
	570	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + A404S + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
20	571	G216L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
	572	V25R + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
25	573	V25G + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
	574	Q27H + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
	575	K24L + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
30	576	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + D650F + L757K		+	**
	577	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + T482A+ K495N + G628W		+	**
35	578	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ A617V + G628W		+	**
	579	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ S501 C + G628W		+	**
40	580	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + K495N + N536K+ G628W + R817P		+	+
	582	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T777N		+	**
45	581	G180E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ R476Q + K495N + G628W		+	**
	583	Q119E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
50	584	A109S + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + K495N+ G628W + S848N		+	+
	585	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + Y850H		+	**
	586	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + P436E + A475L+ K495N + G628W		+	**
55	587	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + R769H + E819A		+	**
	588	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ T496A + G628W		+	**
60	589	Q258N + V260L + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
	590	D244H + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	**
65	591	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + E819V		+	**

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³	
5	592	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S652D	+	**	
10	593	Q258N + Q291W + D311 N + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + R612H + G628W + A689I + K866I	g1479a	+	*
15	594	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T783H	c1917t	+	+
20	595	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T823K		+	**
25	596	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + D650N + S787G		+	**
30	597	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + K708F	g1869a	+	+
35	598	Q258N + Q291W + Q313M + E360D + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + S652D		+	**
40	599	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + E822G	a321g	+	**
45	600	L237Y + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		+	+
50	601	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E494K+ K495N + G628W		+	**
55	602	Q258N + Q291W + Q313M + E360D + D369R + E402N + S434P + D470N+ A475L + K495N + G628W + L757K	c312t	+	*
60	603	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S764F		**	+
65	604	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + D650F		**	**
	605	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + S848N		**	**
	606	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ T496A + N536K + G628W		**	**
	607	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + K421 R + S434P + A475L+ K495N + G628W + T777N		**	**
	608	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ N627H + G628W + E822M		**	**
	609	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + F634A	t1944g+c1962t	**	**
	610	A4V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	c1635t	**	**
	611	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + N437W + A475L+ K495N + G628W		**	**
	612	Y135Q + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W		**	+
	613	Y135Q + Q258N + Q291 W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + V673A + T685V	t99c	**	**
	614	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + L757K + P806L		**	**
	615	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ V559T + G628W	c1476t	**	**

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³
5	616	Y135M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	**	**
10	617	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + V775C	**	+
	618	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ N627H + G628W	**	**
15	619	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + A405T + S434P + A475L+ K495N + G628W	**	**
	620	I221V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	**	**
20	621	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ S501 R + G628W + T685V	**	**
	622	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + A394G + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W + L757K	**	+
25	624	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G616D + G628W	**	+
	623	P161S + Q258N + Q291W + Q313M + D358K + D369R + E402N + S434P+ A475L + K495N + G628W	**	*
30	625	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + K807R	**	+
	626	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + A732M	**	+
35	627	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ A505C + G628W + E822G	**	**
	628	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E493V+ K495N + G628W + S652D	**	+
40	629	A15V + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + G628W	**	+
	630	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + K866Q	**	**
45	631	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E493A+ K495N + G628W + S652D + Q690A	**	+
	632	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + E819L	**	**
50	633	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + E819V	**	+
	634	G180E + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E385L + E402N + S434P+ A475L + K495N + G628W	**	**
55	635	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + D751 N	**	**
	636	G202M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + N627H + G628W + T687K + E822A	**	**
60	637	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + K866I	**	**
	638	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T783Q	**	**
65	639	Q258N + Q291W + Q313M + D369L + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W	**	**

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 269 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 269 ³
640	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + E493Y+ K495N + A505C + G628W		**	**
641	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + T482A+ K495N + G628W + D646N		**	+
642	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + A477G+ K495N + G628W + S764F + S848N		**	+
643	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + I847T		**	+
644	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N+ G628W + T685V + Y850Q	c1434t	**	+
645	Y135M + Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L+ K495N + S501 R + G628W + T685V + T777N	g2472a	**	+
646	Q258N + Q291W + Q313M + D369R + E402N + S434P + A475L + K495N + G628W + Y850Q		**	+
¹ los cambios en aminoácidos están indicados respecto a SEQ ID NO:2; La secuencia del esqueleto contiene sustituciones Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W ² los cambio en nucleotides están indicados respecto a SEQ ID NO:1. ³ Mejora encontrada con respect a laVariante 269 (SEQ ID NO:7) * = 0.2 a 0.5 mejora encontrada ** = 0.6 a 1.0 mejora encontrada + = 1.1 a 1.9 mejora encontrada ++ = 2.0 a 2.9 mejora encontrada +++ = 3.0 a 3.9 mejora encontrada ++++ = 4.0 a 4.9 mejora encontrada				

40 TABLA 5

Tabla 5: Condiciones de termoactividad: pH 4,2, 70 °C durante 21 h. Condiciones de termoestabilidad: la actividad residual enzimática se determinó después de incubar a pH 4,5, 70 °C durante 3 h.

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
481	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A6891+Y715P			
647	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A6891+Y715P		++++	++++
648	A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A6891+Y715P		++++	++
649	A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A6891+Y715P+S764F		++++	++
650	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A6891+Y715P+S764F		+++	+
651	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	c2292t	+++	+

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
5	652	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P	+++	+
10	653	D47I+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+++	++
15	654	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P	+++	++
20	655	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	+++	+
25	656	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	+++	+
30	657	D47I+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	+++	+
35	658	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	+++	+
40	659	D47I+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	+++	+
45	660	D47I+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	++	+
50	661	A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P	++	++
55	662	D47I+1106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	++	++
60	663	Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P	++	+
65	664	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++
	665	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	++	+
	666	D47I+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P	++	+
	667	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732G	c747t	++
	668	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	++	+
	669	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732G	++	++
	670	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	++	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

	Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
5	671	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
10	672	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732M		++	+
15	673	A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F		++	+
	674	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
20	675	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343G+D369R+E402N+S434P+Q474L+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
25	676	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F		++	+
	677	D47I+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	t300c	++	+
30	678	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F		++	+
	679	D47I+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
35	680	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F		++	+
	681	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
40	682	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
	683	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
45	684	A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
	685	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G+P870S		++	++
50	686	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
	687	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732M		++	++
55	688	Q258N+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G		++	+
	689	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732V		++	+
60	690	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
65					

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
5 691	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
10 692	D47I+I106V+Q258N+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G		++	+
15 693	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	c306t	++	+
15 694	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
20 695	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
20 696	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	++
25 697	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P	c1425g	++	+
25 698	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
30 699	C8A+L9F+D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
35 700	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G+D844G		++	+
35 701	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
40 702	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G		++	++
40 703	D47N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G		++	++
45 704	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
45 705	D47I+I106V+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732M		++	+
50 706	A109T+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P		++	+
50 707	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
55 708	V25A+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
55 709	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732M		++	+
60 710	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P		++	+
65 711	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P		++	++

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
5				
712	D47I+A109T+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		++	+
10	713	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	++	+
15	714	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P	c1173t	+
	715	A109T+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	+	+
20	716	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
	717	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
25	718	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	+	+
	719	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P	c1425g	+
30	720	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
	721	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
35	722	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	+	+
	723	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P	c1425g	+
40	724	L237Y+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	**
	725	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
45	726	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
	727	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
50	728	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+L757K	+	+
	729	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
55	730	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
	731	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604C+G628W+A689I+Y715P	+	+
60	732	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+R476G+K495N+N588F+G628W+D651E+A689I+Y715P	+	+
65	733	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+P436Q+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+L757K	+	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

	Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
5	734	I106V+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732M		+	+
10	735	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
	736	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
15	737	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732G	c1425g	+	+
	738	A109T+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
20	739	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+Y736N	c2277a	+	+
25	740	Q258N+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732G		+	+
	741	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+P436Q+A475L+K495N+G616D+G628W+D650Y+A689I+Y715P+L757K		+	+
30	742	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F		+	+
	743	V253F+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Q690K+D709E+E71G+Y715P		+	+
35	744	Q85N+V175A+Q258N+L275Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
	745	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Q690K+Y715P		+	**
40	746	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G616D+G628W+A689I+Y715P+L757K		+	+
	747	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
45	748	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	c57a	+	+
	749	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P		+	**
50	750	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Q690H+Y715P+M816L		+	+
	751	V25A+Q85N+Q258N+L275Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G616D+G628W+A689I+Y715P+V846F		+	+
55	752	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+V846Q		+	+
	753	A79E+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G626D+G628W+A689I+Y715P		+	**
60	754	Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	**
	755	A79E+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P		+	+
65					

(continúa)

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
756	Q258N+Q291W+Q313M+F314L+D369R+Q381V+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
757	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	c1704t	+	+
758	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
759	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+P436Q+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+L757K+V846Q		+	+
760	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+P436Q+A475L+K495N+G628W+D650N+A689I+Y715P		+	+
761	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S550C+G628W+S652D+A689I+Y715P+A732G		+	+
762	A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604A+G628W+A689I+Y715P		+	+
763	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+V846Q		+	+
764	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
765	A109T+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
766	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+N588F+G628W+A689I+Y715P+A732M		+	+
767	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G616D+G628W+A689I+Y715P		+	+
768	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+P436Q+A475L+K495N+G616D+G628W+D650N+A689I+Y715P		+	+
769	A79E+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+V674I+A689I+Y715P		+	+
770	V25A+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+L757K		+	+
771	V25A+Q85H+Q258N+L275F+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+D650N+A689I+Y715P+L757I		+	+

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
772	K24T+A79E+A136L+Q258N+D274Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P		+	+
773	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
774	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	**
775	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	g633a	+	**
776	K24G+A79E+Q258N+D274Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P		+	**
777	Q85N+V175A+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
778	V25A+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+D650N+A689I+Y715P		+	+
779	V25A+Q85N+Q258N+L275Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+L757K		+	+
780	A79M+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P		+	+
781	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+P436Q+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+		+	+
782	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
783	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
784	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	+
785	Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		+	**

55

60

65

(continúa)

	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
5				
	786	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	**
10				
	787	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	**
	788	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	+	+
15				
	789	Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	g927a	+
	790	I106V+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	+
20				
	791	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604A+G628W+A689I+Y715P	**	+
	792	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	+
25				
	793	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	**
	794	V25A+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	**
30				
	795	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+Q474I+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	**	+
	796	Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	+
35				
	797	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+N588F+G628W+A689I+Y715P	**	+
40				
	798	S58G+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+Q381V+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	+
	799	V253F+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+T785L+M816L	**	+
45				
	800	A243G+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+S764F	**	+
	801	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+N588F+G628W+S652D+A689I+Y715P+D733G	c597t	++
50				
	802	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+V846L	**	**
	803	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604A+G628W+A689I+Y715P	**	+
55				
	804	A79G+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+T777N	**	+
	805	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	**
60				
	806	V25A+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P	**	**
	807	K24T+A79E+Q258N+D274Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P+T777N	**	+
65				
	808	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604V+G628W+T687C+A689I+Y715P+S764F+L869R	**	+

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 481 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 481 ³
5 809	Q258N+D274Y+Q291W+Q313M+D369R+E385L+E402N+S434P+A475L+K495N+G626D+G628W+A689I+Y715P+T777N		**	**
10 810	S58G+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+Q381V+E402N+S434P+N437D+A475L+K495N+G628W+A689I+Q690H+D709E+E710G+Y715P	c489t	**	**
15 811	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+Q474I+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P		**	+
20 812	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+N437K+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+T785L		**	+
25 813	A109S+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604I+G628W+A689I+Y715P		**	+
30 814	Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604V+G628W+A689I+Y715P+K807R	c624t	**	+
35 815	Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604V+G628W+A689I+Y715P		**	+
40 816	Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+L757K		**	**
45 817	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+K495N+N588F+G628W+S652D+A689I+Y715P	c1425g	**	+
50 818	A79M+A136L+Q258N+D274Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P+T783A		**	+
55 819	D47I+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+S604V+G628W+A689I+Y715P+S764F		**	+
60 820	S58G+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+T785L		**	**
65 821	K24G+A136L+Q258N+D274Y+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P+T777N	g240a	*	**
70 822	S58G+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+Q381V+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+T785L	c2007t	*	+
75 823	S58G+Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P+T785L+M816L		*	**
80	<p>1 Los cambios en aminoácidos están indicados respecto a SEQ ID NO:2; La secuencia del esqueleto contiene sustituciones Q258N+Q291W+Q313M+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+A689I+Y715P.</p> <p>2 Los cambios en Nucleótidos están indicados respecto a SEQ ID NO:1.</p> <p>3Mejoras encontradas con respect aVariante 481 (SEQ ID NO:9):</p> <p>* = 0.2 a 0.5 mejora encontrada</p> <p>** = 0.6a 1.0 mejora encontrada</p> <p>+ = 1.1 a 1.9 mejora encontrada</p> <p>++ = 2.0 a 2.9 mejora encontrada</p> <p>+++ = 3.0 a 3.9 mejora encontrada</p> <p>++++ = 4.0 a 4.9 mejora encontrada</p>			

Tabla 6

Tabla 6: Condiciones de termoactividad: pH 4, 70 °C durante 21 h. Condiciones de termoestabilidad: la actividad residual enzimática se determinó después de incubar a pH 4,5, 70 °C durante 24 h. Se indican cambios de aminoácidos y de nucleótidos silenciosos con respecto a la secuencia natural.

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 647 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 647 ³
647	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P			
824	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732M		++++	+
825	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P+A732G		++++	+
826	D47I+A79E+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687W+A689I+Y715P	c1947t	+++	++
827	D47I+A79E+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	**
828	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687C+A689I+Y715P+S764Y+R769H	c1677t	+++	++
829	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	++
830	D47I+A79M+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	++
831	D47I+A79M+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687C+A689I+Y715P+A732G	t756c	+++	++
832	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+T687C+A689I+Y715P+A732G		+++	+
833	D47I+A79M+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G		+++	**
834	D47I+Q258N+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G		+++	+
835	D47I+A79E+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+T687W+A689I+Y715P+A732V		+++	++
836	D47I+A79M+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732M		+++	*
837	D47I+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P		+++	**
838	D47I+A79G+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G		+++	+
839	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P+A732G		+++	++

(continúa)

5	Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 647 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 647 ³
10	840	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732M		+++	**
15	841	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	**
20	842	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P+A732G		+++	**
25	843	D47I+A79G+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732M		+++	**
30	844	D47I+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	+
35	845	D47I+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G		+++	+
40	846	D47I+A79M+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P		+++	*
45	847	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	**
50	848	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P+A732G	c498t	+++	+
55	849	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	++
60	850	D47I+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P+A732G		+++	++
65	851	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687C+A689I+Y715P	c1335t	+++	**
	852	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G		+++	+
	853	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P+A732G		+++	++
	854	D47I+A79G+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	**
	855	D47I+A79M+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G		+++	*
	856	D47I+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P		+++	*
	857	D47I+Q85N+Q258N+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P		+++	++

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 647 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 647 ³
5 10	858	D47I+A79G+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G	+++	**
15	859	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P	c1377t ++	+
20	860	D47I+Q85N+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P	++	+
25	861	D47I+A79G+Q258N+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P	+	++
30	862	D47I+Q258N+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P	+	+
35	863	D47I+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+D646N+T687K+A689I+Y715P+A732G	+	+
40	864	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P	+	+
45	865	D47I+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732V	+	+
50	866	D47I+A79G+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+P439S+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P	+	*
55	867	D47I+Q85N+Q258N+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+D395N+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732V	+	+
60	868	D47I+A79G+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687C+A689I+T693A+Y715P+T827I	**	+
65	869	D47I+Q85N+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732V	t237g **	+
	870	D47I+A79G+Q258N+L275Y+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+A505C+G628W+T687K+A689I+T693E+N723G+A730S+Y855*	a2185c **	+
<p>1 Los cambios en aminoácidos están indicados respecto a SEQ ID NO:2; La secuencia del esqueleto contiene sustituciones D47I+Q258N+Q291W+Q313M+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687K+A689I+Y715P.</p> <p>2 Los cambios en Nucleótidos están indicados respecto a SEQ ID NO:1.</p> <p>3 Mejoras encontradas con respecto a Variante 647 (SEQ ID NO:15): * = 0.2a 0.5 mejoras encontradas ** = 0.6 a 1.0 mejoras encontradas + = 1.1 a 1.9 mejoras encontradas ++ = 2.0 a 2.9 mejoras encontradas +++ = 3.0 a 3.9 mejoras encontradas ++++ = 4.0 a 4.9 mejoras encontradas</p>				

TABLA 7

Tabla 7: Condiciones de termoactividad: pH 4, 70 °C durante 21 h. Condiciones de termoestabilidad: la actividad residual enzimática se determinó después de incubar a pH 4,5, 70 °C durante 24 h.

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 664 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 664 ³
664	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732 G	c1425g		
871	D47I+A79E+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
872	D47I+A79E+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	+++	+
873	A79M+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c246t+c1425g+ c2346t	+++	+
874	D47I+A79E+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	+++	+
875	D47I+A79G+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	+++	+
876	A79E+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	+++	+
877	A79G+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+L275F+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+T687C+A689I+Y715P+A732 G	c1425g	++	+
878	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
879	D47I+A79E+Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
880	D47I+A79E+Q85N+I106V+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+N315D+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+T687W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	**
881	D47I+Q85N+I106V+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+ A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
882	A79E+Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+G628 W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
883	A79G+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687 W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
884	D47I+A79G+Q85N+I106V+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g+g2235a	++	+
885	D47I+Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+ G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g+	++	+
886	D47I+A79E+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G 628W+A689I+Y715P+A732G	c811t+c1425g	++	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 664 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 664 ³
5				
887	D47I+A79M+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G 628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
10				
888	D47I+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628 W+A689I+Y715P+A732G	c1425g+c1806t	++	+
15				
889	D47I+A79G+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G 628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
20				
890	A79M+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P +A732G	c1425g	++	+
25				
891	A79M+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C +G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
30				
892	A79M+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628 W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
35				
893	D47I+A79G+Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+ G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g+c2541t	++	+
40				
894	A79E+Q85H+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I +Y715P+A732G	c540t+c1425g	++	+
45				
895	D47I+A79G+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+ A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
50				
896	A79G+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W +A689I+Y715P+A732G	c1425	++	+
55				
897	D47I+A79E+Q85N+I106V+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K 495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
60				
898	D47I+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I +Y715P+A732G	c468t+c1425g	++	+
65				
899	C8G+D47I+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A 689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
900	A79E+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I +Y715P+A732G	c1425g	++	+
901	A79G+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W +A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
902	D47I+A79G+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+T 591I+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
903	Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628 W+A689I+Y715P+A732G	g150a+c1425g	++	+
904	A79M+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689 I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
905	Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689 I+Y715P+A732G	c1425g	++	+

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 664 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 664 ³	
5					
10	906	Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
15	907	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+T687K+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	**
20	908	Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
25	909	D47I+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343G+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	t237q+c1425g	++	+
30	910	D47I+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
35	911	D47I+Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
40	912	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c933t+c1425g	++	+
45	913	I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	**
50	914	D47I+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	**
55	915	D47I+Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+A475L+K495N+G628W+T687C+A689I+Y715P+A32G		++	+
60	916	D47I+A79M+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
65	917	A79G+Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+A505C+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
	918	D47I+A79E+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
	919	Q85N+I106V+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+T687W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	**
	920	I106V+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	**
	921	D47I+Q85N+I106V+A109T+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314V+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
	922	Q85N+I106V+A109S+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314V+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
	923	D47I+A79M+I106V+A109S+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+
	924	A79M+Q85N+I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G	c1425g	++	+

ES 2 455 269 T3

(continúa)

Variante Número	Cambios ¹ en Aminoácidos	Cambios ² en nucleótidos silenciosos	Mejora encontrada en actividad sobre 664 ³	Mejora encontrada en estabilidad sobre 664 ³
925	A79M+Q85N+I106V+Q258N+V260G+L275Y+Q291W+Q313M+F314L+A343C+D369R+E402N+S434P+K495N +A505C+G628W+A689I+Y715P+A732G	c699t+c14 25g	++	**
<p>1 Los cambios en aminoácidos están indicados respecto a SEQ ID NO:2; La secuencia del esqueleto contiene sustituciones I106V+Q258N+V260G+Q291W+Q313M+F314L+D369R+E402N+S434P+K495N+G628W+A689I+Y715P+A732G.</p> <p>2 Los cambios en Nucleótidos están indicados respecto a SEQ 10 NO:1.</p> <p>3 Mejoras encontradas con respecto o a Variante 664 (SEQ ID NO:13)</p> <p>* = 0.2 a 0.5 mejoras encontradas</p> <p>** = 0.6 a 1.0 mejoras encontradas</p> <p>+ = 1.1 a 1.9 mejoras encontradas</p> <p>++ = 2.0 a 2.9 mejoras encontradas</p> <p>+++ = 3.0 a 3.9 mejoras encontradas</p>				

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

La Tabla 8 ilustra propiedades a modo de ejemplo de variantes de Bgl C1 con elevada termoactividad y/o termoestabilidad en comparación con la enzima natural.

TABLA 8

Un ejemplo de realización tiene	Al menos x veces mayor=	Actividad	La variante No.	Bajo condiciones	Variante(s) Ejemplar(es)	Ver tabla
	5	Termoactividad	De tipo salvaje	pH 5, 65°C, 21h	3	2
	2	Termoestabilidad*	De tipo salvaje	pH 5, 65°C, 6h	3	2
	2,3,4,5 o 6	Termoactividad	3	pH 5, 70°C, 21h	269	3
	1.1,2 o 3	Termoestabilidad	3	pH 5, 65°C, 16h	269	3
	2,3 o 4	Termoactividad	269	pH 4.5, 70°C, 21h	481	4
	1.1 o 2	Termoestabilidad	269	pH 4.5, 70°C, 2h	481	4
	2,3 o 4	Termoactividad	481	pH 4.2, 70°C, 21h	647	5
	1.1, 2 o 4	Termoestabilidad	481	pH 4.5, 70°C, 3h	647	5
	3 o 4	Termoactividad	647	pH 4, 70°C, 21 h	824, 825	6
	1,1 o 2	Termoestabilidad	647	pH 4.5, 70°C, 24h	824, 825	6
	2 o 3	Termoactividad	664	pH 4, 70°C, 21 h	871, 885, 916	7
	1,1	Termoestabilidad	664	pH 4.5, 70°C, 24h	871, 885, 916	7

Por ejemplo, en algunas realizaciones, una variante tiene al menos 5 veces mayor termoactividad y/o al menos 2 veces mayor termoestabilidad que Bgl1 natural. Para ejemplo y no limitación, la variante 3 tiene estas propiedades. Por ejemplo, en otra realización, una variante tiene al menos 4 veces mayor termoactividad y/o al menos 4 veces mayor termoestabilidad que la variante 481 de Bgl1. Por ejemplo y no limitación, la variante 647 tiene estas propiedades.

Las secuencias de aminoácidos de variantes de β -glucosidasa no específicamente descritas en el presente documento pueden generarse e identificarse fácilmente usando procedimientos que son muy conocidos para aquellos que son expertos habituales en la materia. Algunas variantes de β -glucosidasa de la invención que tienen al menos el 70 % de identidad de secuencias con los residuos 20-870 de SEC ID N°: 2 y una o más sustituciones desveladas en el presente documento también tienen una o más sustituciones, deleciones o inserciones, además de aquellas específicamente desveladas en el presente documento. El efecto, si lo hay, de tales sustituciones, deleciones o inserciones sobre la actividad de β -glucosidasa y termoestabilidad puede determinarse usando ensayos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento (véanse, por ejemplo, los Ejemplos 3 y 5, más adelante). Para ilustración, la variante número 1 en la Tabla 2 tiene las siguientes sustituciones con respecto a los residuos 20-870 de SEC ID N°: 2: M181Y+Q291W+E402N+S434P. Para determinar el efecto de otra sustitución (por ejemplo, sustitución de isoleucina en la posición 20 con leucina) la variante (en este caso, I20L+M181Y+Q291W+E402N+S434P) se expresa y sus propiedades se comparan con la parental (en este caso, M181Y+Q291W+E402N+S434P).

Además, pueden generarse bibliotecas de variantes de polipéptido de β -glucosidasa (y polinucleótidos que codifican las variantes) de una secuencia parental (por ejemplo, tal como una o más variantes ejemplificadas en el presente documento) y cribarse usando selección de alto rendimiento para la presencia de actividad de β -glucosidasa descrita en, por ejemplo, el Ejemplo 5. Los procedimientos de mutagénesis y evolución dirigida conocidos en la técnica pueden aplicarse fácilmente a polinucleótidos que codifican variantes de β -glucosidasa ejemplificadas en el presente documento para generar bibliotecas de variante que pueden expresarse, cribarse y ensayarse usando los procedimientos descritos en el presente documento. Los procedimientos de mutagénesis y evolución dirigida son muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Ling y col., 1999, "Approaches to DNA mutagenesis: an overview", *Anal. Biochem.*, 254(2):157-78; Dale y col., 1996, "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method", *Methods Mol. Biol.*, 57:369-74; Smith, 1985, "In vitro mutagenesis", *Ann. Rev. Genet.*, 19:423-462; Botstein y col., 1985, "Strategies and applications of in vitro mutagenesis", *Science*, 229:1193-1201; Carter, 1986, "Site-directed mutagenesis", *Biochem. J.*, 237:1-7; Kramer y col., 1984, "Point Mismatch Repair", *Cell*, 38:879-887; Wells y col., 1985, "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites", *Gene*, 34:315-323; Minshull y col., 1999, "Protein evolution by molecular breeding", *Current Opinion in Chemical Biology*, 3:284-290; Christians y col., 1999, "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling", *Nature Biotechnology*, 17:259-264; Cramer y col., 1998, "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution", *Nature*, 391:288-291; Cramer y col., 1997, "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling", *Nature Biotechnology*, 15:436-438; Zhang y col., 1997 "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening", *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 94:45-4-4509; Cramer y col., 1996, "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling", *Nature Biotechnology*, 14:315-319; Stemmer, 1994, "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling", *Nature*, 370:389-391; Stemmer, 1994, "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 91:10747-10751; documentos WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; y WO 01/75767, todos incorporados en el presente documento por referencia.

En la generación de variantes que comprenden sustituciones, inserciones o deleciones en las posiciones, además de aquellas descritas arriba, el profesional habitual en la técnica sabrá que ciertas regiones de la proteína β -glucosidasa son menos tolerantes que otras a sustituciones (especialmente sustituciones no conservativas). Así, en algunas realizaciones, las proteínas Bgl1 de variante retienen residuos conservados y dominios funcionales de las parentales.

Actividad de β -glucosidasa y ensayos de termoestabilidad

La actividad de β -glucosidasa puede determinarse mediante procedimientos descritos en los Ejemplos 3 y 5, además de cualquier otro procedimiento conocido en la técnica. La actividad de β -glucosidasa puede determinarse, por ejemplo, usando un ensayo de para-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNPG) o usando un ensayo de celobiosa.

Por ejemplo, puede usarse un ensayo basado en pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido) colorimétrico para medir la actividad de α -glucosidasa. Un ensayo tal se describe en el Ejemplo 3, más adelante. En otro ensayo de pNPG a modo de ejemplo, en un volumen total de 100 μ l, 20 μ l de sobrenadante de medio claro que contiene la enzima β -glucosidasa se añaden a disolución de pNPG 4 mM (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO) en tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 5. Las reacciones se incuban a pH 5, 50 °C durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se inactiva con 100 μ l de disolución de carbonato sódico 1 M a pH 11. La absorbancia de la disolución se mide a 405 nm para determinar la conversión de pNPG en p-nitrofenol. La liberación de p-nitrofenol ($\epsilon = 17,700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se mide a 405 nm para calcular la actividad de β -glucosidasa. La actividad de β -glucosidasa detectable se observa bajo condiciones de selección de alto rendimiento (pH 7, 50 °C). Véase Breves y col., 1997, *Appl. Environmental Microbiol.* 63:3902, incorporado en el presente documento por referencia.

Alternativamente, la actividad de β -glucosidasa puede determinarse usando un ensayo en el que la celobiosa es el sustrato. Un ensayo adecuado se describe en el Ejemplo 3, más adelante. Otro ensayo adecuado se lleva a cabo del siguiente modo: en un volumen total de 100 μ l, 25 μ l de sobrenadante de medio claro que contiene la enzima β -glucosidasa se añade a 10 g/l de celobiosa (cat. de Fluka n° 22150, Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 6-7) o tampón acetato sódico (pH 5-5,5). La reacción se incubaba a 45-70 °C durante un tiempo apropiado (25 minutos a durante la noche dependiendo de la concentración de enzima) mientras que se agita. La producción de glucosa puede determinarse usando cualquier número de procedimientos conocidos en la materia para medir glucosa. En un enfoque, la producción de glucosa se determina usando un ensayo de glucosa enzimático (K-GLUC, Megazyme, Irlanda). Se añaden 10 μ l de cada reacción a 190 μ l de reactivo GOPOD (suministrado como parte del kit de ensayo de K-GLUC). La reacción se incubaba a 45 °C durante 20 minutos y la absorbancia de la disolución se midió a 510 nm. El reactivo GOPOD contiene tampón fosfato potásico 50 mM a pH 7,4, ácido p-hidroxibenzoico 0,011 M, 0,008 % en peso/volumen de azida de sodio, glucosa oxidasa (>12.000 U/l), peroxidasa (>650 U/l) y 80 mg/l de 4-aminoantipirina. La enzima glucosa oxidasa en el reactivo reacciona con cualquier glucosa presente en la muestra y produce peróxido de hidrógeno que luego reacciona con la 4-aminoantipirina para producir un colorante de quinoneimina en cantidades proporcionales a la cantidad de glucosa presente y puede medirse espectrofotométricamente a 510 nm.

Péptido señal

En general, los polipéptidos de β -glucosidasa son secretados de la célula huésped en la que se expresan (por ejemplo, una levadura o célula fúngica) y se expresan como una pre-proteína que incluye un péptido señal, es decir, una secuencia de aminoácidos ligada al extremo amino de un polipéptido y que dirige el polipéptido codificado en la ruta secretora de células. En una realización, el péptido señal es el péptido señal de β -glucosidasa C1 endógeno que tiene la secuencia expuesta como los residuos 1-19 de SEC ID N°: 2. En otras realizaciones se usan los péptidos señal de otras proteínas secretadas C1.

Pueden usarse todavía otros péptidos señal, dependiendo de la célula huésped y otros factores. Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas incluyen, pero no se limitan a, las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa* y celobiohidrolasa II de *T. reesei* (TrCBH2).

Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica NCIB 11837 de *Bacillus*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, β -lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y prsA de *Bacillus subtilis*. Péptidos señal adicionales se describen por Simonen y Palva, 1993, Microbiol Rev 57: 109-137 (incorporado en el presente documento por referencia).

Péptidos señal útiles para células huésped de levadura también incluyen aquellos de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, invertasa SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae* (véase Taussig y Carlson, 1983, Nucleic Acids Res 11:1943-54; n° de acceso de SwissProt P00724), y otros. Véase, por ejemplo, Romanos y col., 1992, Yeast 8:423-488. Son adecuadas variantes de estos péptidos señal y otros péptidos señal.

Polipéptidos de fusión y elementos de secuencia adicionales

En algunas realizaciones, una variante de polipéptido de β -glucosidasa de la invención incluye secuencias adicionales que no alteran la actividad codificada de una β -glucosidasa. Por ejemplo, la β -glucosidasa puede ligarse a una marca de epítipo o a otra secuencia útil en la purificación de β -glucosidasa.

La presente invención también proporciona polipéptidos de fusión de variante de β -glucosidasa, en los que el polipéptido de fusión comprende una secuencia de aminoácidos que codifica un polipéptido de variante de β -glucosidasa de la presente invención o fragmento del mismo, ligado tanto directamente como indirectamente mediante el extremo N o C del polipéptido de variante de β -glucosidasa a una secuencia de aminoácidos que codifica al menos un segundo polipéptido (adicional). El polipéptido de fusión de variante de β -glucosidasa puede incluir adicionalmente secuencia de aminoácidos que codifica un tercer, cuarto, quinto o polipéptidos adicionales. Normalmente, cada polipéptido adicional tiene una actividad biológica, o alternativamente, es una porción de un polipéptido que tiene una actividad biológica, en el que la porción tiene el efecto de mejorar la expresión y/o secreción del polipéptido de fusión del huésped de expresión deseado. Estas secuencias pueden fusionarse, tanto directamente como indirectamente, al extremo N o C del polipéptido de variante de β -glucosidasa o fragmento del mismo, o alternativamente, al extremo N o C de los polipéptidos adicionales que tienen actividad biológica.

Normalmente, el (los) polipéptido(s) adicional(es) codifican una enzima o fragmento activo de la misma, y/o un polipéptido que mejora la expresión y/o secreción del polipéptido de fusión de la célula huésped de expresión deseada. Más normalmente, el (los) polipéptido(s) adicional(es) codifica(n) una celulasa (por ejemplo, una β -glucosidasa que tiene una secuencia de aminoácidos diferente del polipéptido de variante de β -glucosidasa en el polipéptido de fusión (por ejemplo, una β -glucosidasa natural o una variante de la misma, que incluye un polipéptido de variante de β -glucosidasa de *T. aurentiacus* diferente), o un polipéptido que presenta actividad de CBH o EG) y/o un polipéptido que mejora la expresión y secreción de la célula huésped deseada tal como, por ejemplo, un polipéptido que normalmente se expresa y secreta del huésped de expresión deseado, tal como un polipéptido secretado normalmente expresado a partir de hongos filamentosos. Éstos incluyen glucoamilasa, α -amilasa y aspartil proteasas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger var. awamori* y *Aspergillus oryzae*, celobiohidrolasa I, celobiohidrolasa II, endoglucanasa I y endoglucanasa III de *Trichoderma* y glucoamilasa de especies de *Neurospora* y *Humicola*. Véase el documento WO 98/31821, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Los componentes de polipéptido del polipéptido de fusión pueden ligarse entre sí indirectamente mediante un ligador. Ligadores adecuados para su uso en la práctica de la presente invención se describen en el documento WO 2007/075899, que se incorpora en el presente documento por referencia. Ligadores a modo de ejemplo incluyen ligadores de péptido de 1 a aproximadamente 40 residuos de aminoácidos de longitud, que incluyen aquellos de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos de longitud, y aquellos de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 residuos de aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los ligadores pueden estar constituidos por un único residuo de aminoácido tal como, por ejemplo, un residuo de Gly, Ser, Ala o Thr o combinaciones beneficiosas de los mismos, particularmente Gly y Ser. Los ligadores empleados en la práctica de la presente invención pueden ser escindibles. Ligadores escindibles adecuados pueden contener un sitio de escisión,

tal como un sitio de reconocimiento de proteasa. Sitios de reconocimiento de proteasa a modo de ejemplo son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, Lys-Arg (el sitio de reconocimiento de la proteasa KEX2, que puede escindirse por una proteasa similar a KEX2 de *Aspergillus* nativo), Lys y Arg (los sitios de reconocimiento de la proteasa tripsina). Véase, por ejemplo, el documento WO 2007/075899, que se incorpora en el presente documento por referencia.

IV. POLINUCLEÓTIDOS DE β -GLUCOSIDASA Y SISTEMAS DE EXPRESIÓN

La presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican variantes de β -glucosidasa C1 de la invención. Las secuencias genómicas y de ADNc de C1 se describen en la Sección II, arriba.

En una realización, para la expresión de una variante de β -glucosidasa descrita en el presente documento puede usarse la secuencia de ADNc de β -glucosidasa C1 natural (SEC ID N°: 1), o la porción de la misma que comprende el marco de lectura abierto (con cambios según se requiera en los codones correspondientes a sustituciones (residuos mutados con respecto a la secuencia natural). Además, puede incorporarse uno o más de los cambios de nucleótidos "silenciosos" mostrados en la Tabla 2, Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5, Tabla 6 o Tabla 7.

Aquellos expertos habituales en la materia entenderán que debido a la degeneración del código genético existe una multitud de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de β -glucosidasa de la presente invención. La Tabla 9 proporciona el código genético de triplete convencional para cada aminoácido. Por ejemplo, los codones AGA, AGG, CGA, CGC, CGG y CGU codifican todos el aminoácido arginina. Así, en cada posición en los ácidos nucleicos de la invención en los que una arginina está especificada por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos anteriormente sin alterar el polipéptido codificado. Se entiende que U en una secuencia de ARN se corresponde con T en una secuencia de ADN. La invención contempla y proporciona todas y cada una de las posibles variaciones de secuencia de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención que podría prepararse seleccionando combinaciones beneficiosas basadas en posibles elecciones de codones.

También puede diseñarse una secuencia de ADN para codones de sesgo de alto uso de codones (codones que se usan a mayor frecuencia en las regiones codificantes de proteína que otros codones que codifican el mismo aminoácido). Los codones preferidos pueden determinarse en relación con el uso de codones en un único gen, un conjunto de genes de función u origen común, genes altamente expresados, la frecuencia de codones en las regiones codificantes de proteína agregadas del organismo completo, frecuencia de codones en las regiones codificantes de proteína agregadas de organismos relacionados, o combinaciones beneficiosas de los mismos. Los codones cuya frecuencia aumenta con el nivel de expresión génica son normalmente codones óptimos para la expresión. En particular, una secuencia de ADN puede optimizarse para la expresión en un organismo huésped particular. Referencias que proporcionan información de preferencia para una amplia gama de organismos están fácilmente disponibles. Véase, por ejemplo, Henaut y Danchin en "Escherichia Salmonella", Neidhardt y col. Eds., ASM Pres, Washington D.C. (1996), pág. 2047-2066, que se incorpora en el presente documento por referencia. Para ilustración, y no para limitación, la SEC ID N°: 3 muestra una secuencia de polinucleótidos que codifica Bgl1 C1 diseñada con sesgo de codones para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.

TABLA 9: CÓDIGO GENÉTICO

Amino acid			Codon					
Alanine	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
Cysteine	Cys	C	UGC	UGU				
Aspartic acid	Asp	D	GAC	GAU				
Glutamic acid	Glu	E	GAA	GAG				
Phenylalanine	Phe	F	UUC	UUU				
Glycine	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
Histidine	His	H	CAC	CAU				
Isoleucine	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
Lysine	Lys	K	AAA	AAG				
Leucine	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
Methionine	Met	M	AUG					
Asparagine	Asn	N	AAC	AAU				
Proline	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
Glutamine	Gln	Q	CAA	CAG				
Arginine	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
Serine	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
Threonine	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
Valine	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
Tryptophan	Trp	W	UGG					
Tyrosine	Tyr	Y	UAC	UAU				

Se conocen una variedad de procedimientos para determinar la frecuencia de codones (por ejemplo, uso de codones, uso de codones sinónimos relativos) y preferencia de codones en organismos específicos, que incluyen análisis multifactorial, por ejemplo, usando análisis de agrupaciones o análisis de correspondencia, y el número eficaz de codones usados en un gen (véase GCG CodonPreference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; Codon W, John Peden, Universidad de Nottingham; McInerney, J. O, 1998, Bioinformatics 14:372-73; Stenico y col., 1994, Nucleic Acids Res. 22:437-46; Wright, F., 1990, Gene 87:23-29; Wada y col., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118; Nakamura y col., 2000, Nucl. Acids Res. 28:292; Henaut y Danchin, "Escherichia coli and Salmonella", 1996, Neidhardt y col. Eds., ASM Press, Washington D.C., pág. 2047-2066, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia). La fuente de datos para obtener el uso de codones puede basarse en cualquier secuencia de nucleótidos disponible que pueda codificar una proteína. Estos conjuntos de datos incluyen secuencias de ácidos nucleicos en realidad conocidas por codificar proteínas expresadas (por ejemplo, secuencias codificantes de proteínas completas-CDS), marcas de secuencia expresadas (EST) o regiones codificantes predichas de secuencias genómicas (véase, por ejemplo, Mount, D., Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis, Capítulo 8, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; Uberbacher, E. C., 1996, Methods Enzymol. 266:259-281; Tiwari y col., 1997, Comput. Appl. Biosci. 13:263-270, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia).

Para la expresión de una variante de β -glucosidasa en C1 o huésped de *M. Thermophila* puede usarse la secuencia de ADNc de β -glucosidasa C1 natural (SEC ID N°: 1), o la porción de la misma que comprende el marco de lectura abierto (con cambios según se requiera en los codones correspondientes a sustituciones (residuos mutados con respecto a la secuencia natural). Además, puede incorporarse uno o más de los cambios de nucleótidos "silenciosos" mostrados en la Tabla 2. Estos cambios pueden afectar la actividad de β -glucosidasa en una variedad de formas. Por ejemplo, sin pretender ligarse a un mecanismo particular, las mutaciones silenciosas pueden aumentar la estabilidad de ARNm que codifica la proteína de variante.

Vectores de expresión

La presente invención hace uso de construcciones recombinantes que comprenden una secuencia que codifica una β -glucosidasa como se ha descrito anteriormente. En un aspecto particular la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido de β -glucosidasa operativamente ligado a un promotor heterólogo. Los vectores de expresión de la presente invención pueden usarse para transformar una célula huésped apropiada para permitir que el huésped exprese la proteína β -glucosidasa. Procedimientos para la expresión recombinante de proteínas en hongos y otros organismos son muy conocidos en la técnica, y están disponibles varios vectores de expresión o pueden construirse usando procedimientos rutinarios. Véase, por ejemplo, Tkacz y Lange, 2004, ADVANCES IN FUNGAL BIOTECHNOLOGY FOR INDUSTRY, AGRICULTURE, AND MEDICINE, KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBLISHERS. New York; Zhu y col., 2009, Construction of two Gateway vectors for

gene expression in fungi Plasmid 6:128-33; Kavanagh, K. 2005, FUNGI: BIOLOGY AND APPLICATIONS Wiley, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención comprenden un vector, tal como un plásmido, un cósmido, un fago, un virus, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), y similares, en los que se ha insertado una secuencia de ácidos nucleicos de la invención. Los polinucleótidos de la presente invención pueden incorporarse en uno cualquiera de una variedad de vectores de expresión adecuados para expresar un polipéptido. Vectores adecuados incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones beneficiosas de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como variolovacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, seudorrabia, adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus y muchos otros. Puede usarse cualquier vector que transduzca material genético en una célula y, si se desea la replicación, que sea replicable y viable en el huésped relevante.

En un aspecto de esta realización, la construcción comprende además secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor operativamente ligado a la secuencia codificante de proteína. Números grandes de vectores adecuados y promotores son conocidos para aquellos expertos en la materia.

Construcciones de promotor/gen

Como se trata anteriormente, para obtener altos niveles de expresión en un huésped particular es frecuentemente útil expresar β -glucosidasa C1 bajo control de un promotor heterólogo. Normalmente, una secuencia promotora puede estar operativamente ligada a la región 5' de la secuencia codificante de β -glucosidasa C1 usando procedimientos rutinarios.

Ejemplos de promotores útiles para la expresión de polinucleótidos de β -glucosidasa incluyen promotores de hongos. Por ejemplo, pueden usarse secuencias promotoras que accionan la expresión de genes distintos del gen 1 de β -glucosidasa en C1. Por ejemplo, puede usarse un promotor fúngico de un gen que codifica celobiohidrolasa.

Ejemplos de otros promotores adecuados útiles para dirigir la transcripción de las construcciones de nucleótidos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable ácida de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*glaA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans* y proteasa similar a tripsina de *Fusarium oxysporum* (documento WO 96/00787, que se incorpora en el presente documento por referencia), además del promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), promotores tales como *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *pepA*, *hfb1*, *hfb2*, *xyn1*, *amy* y *glaA* (Nunberg y col., 1984, Mol. Cell Biol., 4:2306-2315, Boel y col., 1984, EMBO J. 3:1581-85 y documento EPA 137280, todos los cuales incorporan en el presente documento por referencia), y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos. En un huésped de levadura, promotores útiles pueden ser de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*eno-1*), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (*gal1*), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP) y 3-fosfoglicerato cinasa de *S. cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos y col., 1992, Yeast 8:423-488, incorporado en el presente documento por referencia. Pueden usarse promotores asociados a la producción de quitinasa en hongos. Véanse, por ejemplo, Blaiseau y Lafay, 1992, Gene 120243-248 (hongo filamentoso *Aphanocladium album*); Limon y col., 1995, Curr. Genet, 28:478-83 (*Trichoderma harzianum*), ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus y que pueden usarse en algunas realizaciones de la invención incluyen promotor SV40, promotor lac o trp de *E. coli*, promotor P_L del fago lambda, promotor tac, promotor T7, y similares. En células huésped bacterianas, promotores adecuados incluyen los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyI*), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amiloliquefaciens* (*amyQ*), genes *xyIA* y *xyIB* de *Bacillus subtilis* y gen de β -lactamasa procariota.

Puede usarse cualquier otra secuencia promotora que accione la expresión en una célula huésped adecuada. Secuencias promotoras adecuadas pueden identificarse usando procedimientos muy conocidos. En un enfoque, una secuencia promotora putativa se liga en 5' a una secuencia que codifica una proteína indicadora, la construcción se transfecta en la célula huésped (por ejemplo, una célula C1) y se mide el nivel de expresión del indicador. La expresión del indicador puede determinarse midiendo, por ejemplo, niveles de ARNm de la secuencia indicadora, una actividad enzimática de la proteína indicadora, o la cantidad de proteína indicadora producida. Por ejemplo, la actividad promotora puede determinarse usando la proteína verde fluorescente como secuencia codificante (Henriksen y col., 1999, Microbiology 145:729-34, incorporada en el presente documento por referencia) o un gen indicador lacZ (Punt y col., 1997, Gene, 197:189-93, incorporado en el presente documento por referencia). Los

promotores funcionales pueden derivarse de secuencias promotoras que se producen naturalmente por procedimientos de evolución dirigida. Véase, por ejemplo Wright y col., 2005, Human Gene Therapy, 16:881-892, incorporado en el presente documento por referencia.

- 5 Un vector de expresión contiene opcionalmente un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción, y un terminador de la transcripción, tal como PinII. El vector también incluye opcionalmente secuencias apropiadas para amplificar la expresión, por ejemplo, un potenciador.

10 Además, los vectores de expresión de la presente invención contienen opcionalmente uno o más genes marcadores de selección para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas. Genes marcadores adecuados incluyen aquellos que codifican resistencia antimicrobiana tales como resistencia a ampicilina (*ampR*), kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Otros ejemplos incluyen el antimicrobiano estreptomycinina o espectinomycinina (por ejemplo, el gen *aada*), el gen estreptomycinina fosfotransferasa (*spt*) que codifica la resistencia a estreptomycinina, el gen neomicina fosfotransferasa (*neoII*) que codifica resistencia a kanamicina o geneticina, el gen higromicina fosfotransferasa (*hpt*) que codifica resistencia de higromicina. Genes marcadores de selección adicionales incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para cultivo celular eucariota, y resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

20 *Síntesis y manipulación de polinucleótidos de β -glucosidasa*

Los polinucleótidos que codifican β -glucosidasa pueden prepararse usando procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Normalmente, los oligonucleótidos de hasta aproximadamente 40 bases se sintetizan individualmente, luego se unen (por ejemplo, por procedimientos de ligación enzimática o química, o procedimientos mediados por polimerasa) para formar esencialmente cualquier secuencia continua deseada. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención pueden prepararse por síntesis química usando, por ejemplo, el procedimiento de fosforamidito clásico descrito por Beaucage y col., 1981, Tetrahedron Letters, 22:1859-69, o el procedimiento descrito por Matthes y col., 1984, EMBO J. 3:801-05, ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Estos procedimientos se ponen normalmente en práctica en procedimientos sintéticos automatizados. Según el procedimiento de fosforamidito, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

Además, el cliente puede pedir esencialmente cualquier ácido nucleico de cualquiera de una variedad de fuentes comerciales tales como The Midland Certified Reagent Company (Midland, TX), The Great American Gene Company (Ramona, CA), ExpressGen Inc. (Chicago, IL), Operon Technologies Inc. (Alameda, CA), y muchos otras.

Los polinucleótidos también pueden sintetizarse por técnicas muy conocidas como se describen en la bibliografía técnica. Véase, por ejemplo, Carruthers y col., 1982, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47:411-18 y Adams y col., 1983, J. Am. Chem. Soc. 105:661, ambos de los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Los fragmentos de ADN bicatenarios pueden entonces obtenerse tanto sintetizando la hebra complementaria como hibridando las hebras juntas bajo condiciones apropiadas, o añadiendo la hebra complementaria usando ADN polimerasa con una secuencia de cebadores apropiada.

Textos generales que describen técnicas biológicas moleculares que son útiles en el presente documento, que incluyen el uso de vectores, promotores, protocolos suficientes para dirigir a los expertos mediante los procedimientos de amplificación *in vitro*, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la reacción en cadena de la ligasa (LCR), y muchos otros procedimientos relevantes, incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook y col., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 ("Sambrook") y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (complementados hasta 2009) ("Ausubel"), todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Se hace referencia a Berger, Sambrook y Ausubel, además de a Mullis y col., (1987) patente de EE.UU. nº 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis y col., eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1 de octubre de 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3, 81-94; (Kwoh y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173; Guatelli y col., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell y col., (1989) J. Clin. Chem 35, 1826; Landegren y col., (1988) Science 241, 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8, 291-294; Wu y Wallace, (1989) Gene 4, 560; Barringer y col., (1990) Gene 89, 117, y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13: 563-564, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Los procedimientos para la clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados se describen en Wallace y col., patente de EE.UU. nº 5.426.039, que se incorpora en el presente documento por referencia.

60 *Huéspedes de expresión*

La presente invención también proporciona células huésped manipuladas (recombinantes) que se transforman con un vector de expresión o construcción de ADN que codifica β -glucosidasa. Opcionalmente, la expresión de β -glucosidasa en la célula está bajo el control de un promotor heterólogo. Las células huésped de la invención pueden

usarse para producir polipéptidos de β -glucosidasa. Así, la presente invención se refiere a una célula huésped que comprende cualquier polinucleótido de β -glucosidasa de la presente invención que se describe anteriormente en este documento. Como se usa en el presente documento, una célula huésped genéticamente modificada o recombinante incluye la progenie de dicha célula huésped que comprende un polinucleótido de β -glucosidasa que codifica un polipéptido recombinante de la invención. Frecuentemente, la célula huésped genéticamente modificada o recombinante es un microorganismo. En algunas realizaciones, la célula huésped genéticamente modificada o recombinante es una célula eucariota. En algunas realizaciones, la célula huésped genéticamente modificada o recombinante es una célula eucariota. Generalmente, la célula huésped eucariota es una célula no humana. Células huésped eucariotas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células fúngicas, células de alga, células de insecto y células vegetales. En algunos casos, las células huésped pueden modificarse para aumentar la expresión de proteínas, secreción o estabilidad, o para conferir otras características deseadas. Las células (por ejemplo, hongos) que se han mutado o seleccionado para tener actividad de baja proteasa son particularmente útiles para la expresión. Por ejemplo, pueden usarse cepas deficientes en proteasa de *C. lucknowense* (por ejemplo, en las que el sitio de proteasa alcalina se ha delecionado o alterado). En algunas realizaciones, las células huésped, por ejemplo, hongos, pueden modificarse para expresar una celulasa recombinante.

Células huésped fúngicas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, ascomicotas, basidiomicotas, deuteromicotas, zigomicotas y hongos imperfectos. En algunas realizaciones, las células huésped fúngicas son células de levadura y células fúngicas filamentosas. Las células huésped fúngicas filamentosas de la presente invención incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión eumicotas y oomicotas (véase, por ejemplo, Hawksworth y col., en Ainsworth y Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, RU, que se incorpora en el presente documento por referencia). Los hongos filamentosos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta por quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Las células huésped fúngicas filamentosas de la presente invención son morfológicamente distintas de levadura.

En algunas realizaciones, la célula huésped fúngica filamentosas puede ser una célula de una especie de, pero no se limita a, *Achlya*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Cephalosporium*, *Chrysosporium*, *Cochliobolus*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Diplodia*, *Endothia*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Gliocladium*, *Humicola*, *Hypocrea*, *Myceliophthora*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Podospora*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pyricularia*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Sporotrichum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Trametes*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Volvariella*, o teleomorfos, o anamorfos, y sinónimos o equivalentes taxonómicos de los mismos.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Aspergillus*, *Ceriporiopsis*, especie *Chrysosporium*, especie *Corynascus*, especie *Fusarium*, especie *Humicola*, especie *Neurospora*, especie *Penicillium*, especie *Tolypocladium*, especie *Trametes* o especie *Trichoderma*.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Chrysosporium*, por ejemplo, *C. lucknowense*, *C. keratinophilum*, *C. tropicum*, *C. merdarium*, *C. inops*, *C. pannicola* y *C. zonatum*.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Trichoderma*, por ejemplo, *T. longibrachiatum*, *T. viride* (por ejemplo, ATCC 32098 y 32086), o *T. reesei*, un anamorfo de *Hypocrea jecorina* (NRRL 15709, ATCC 13631, 56764, 56765, 56466, 56767 y RL-P37 y derivados de los mismos - véase Sheir-Neiss y col., 1984, Appl. Microbiol. Biotechnology, 20:46-53, que se incorpora en el presente documento por referencia), *T. koningii* y *T. harzianum*. Además, el término "*Trichoderma*" se refiere a cualquier cepa fúngica que se clasificó previamente como *Trichoderma* o se clasifica actualmente como *Trichoderma*.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Aspergillus*, por ejemplo, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. aculeatus*, *A. foetidus*, *A. oryzae*, *A. sojae* y *A. kawachi* (se hace referencia a Kelly y Hynes, 1985, EMBO J. 4, 475479; NRRL 3112, ATCC 11490, 22342, 44733, y 14331; Yelton y col., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1470-1474; Tilburn y col., 1982, Gene 26, 205-221; y Johnston y col., 1985, EMBO J. 4, 1307-1311, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia).

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Fusarium*, por ejemplo, *F. bactridioides*, *F. cerealis*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. graminum*, *F. oxysporum*, *F. roseum* y *F. venenatum*.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Myceliophthora*, por ejemplo, *M. thermophila*.

En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*. Se hace referencia a Case, M.E. y col., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5259-5263; documento USP 4.486.553; y Kinsey, J.A. y J.A. Rambosek, 1984, Molecular and Cellular Biology 4, 117-122, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosas es de la especie *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens*, *H. grisea* y *H. lanuginosa*. En

- algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosa es de la especie *Mucor*, por ejemplo, *M. miehei* y *M. circinelloides*. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosa es de la especie *Rhizopus*, por ejemplo, *R. oryzae* y *R. niveus*. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosa es de la especie *Penicillium*, por ejemplo, *P. purpurogenum*, *P. chrysogenum* y *P. verruculosum*.
- 5 En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosa es de la especie *Thielavia*, por ejemplo, *T. terrestris*. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosa es de la especie *Tolypocladium*, por ejemplo, *T. inflatum* y *T. geodes*. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped fúngica filamentosa es de la especie *Trametes*, por ejemplo, *T. villosa* y *T. versicolor*.
- 10 En la presente invención, una célula huésped de levadura puede ser una célula de una especie de, pero no se limita a, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces* y *Yarrowia*. En algunas realizaciones de la invención, la célula de levadura es *Hansenula polymorpha*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces kluyveri*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia quercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stipitis*, *Pichia methanolica*, *Pichia angusta*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans* y *Yarrowia lipolytica*.
- 15 En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped es un alga tal como, *Chlamydomonas* (por ejemplo, *C. reinhardtii*) y *Phormidium* (P. sp. ATCC29409).
- 20 En otras realizaciones, la célula huésped es una célula procariota. Células procariotas adecuadas incluyen células bacterianas Gram-positivas, Gram-negativas y Gram-variables. La célula huésped puede ser una especie de, pero no se limita a, *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Acinetobacter*, *Acidothermus*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Brevibacterium*, *Butyrivibrio*, *Buchnera*, *Campestris*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Chromatium*, *Coprococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Francisella*, *Flavobacterium*, *Geobacillus*, *Haemophilus*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Ilyobacter*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Prochlorococcus*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Roseburia*, *Rhodospirillum*, *Rhodococcus*, *Scenedesmus*, *Streptomyces*, *Streptococcus*, *Synecoccus*, *Saccharomonospora*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Thermoanaerobacterium*, *Tropheryma*, *Francisella*, *Temecula*, *Thermosynechococcus*, *Thermococcus*, *Ureaplasma*, *Xanthomonas*, *Xylella*, *Yersinia* y *Zymomonas*.
- 25 En algunas realizaciones, la célula huésped es una especie de *Agrobacterium*, *Acinetobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Buchnera*, *Geobacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Streptomyces* y *Zymomonas*.
- 30 En todavía otras realizaciones, la cepa huésped bacteriana es no patogénica para seres humanos. En algunas realizaciones, la cepa huésped bacteriana es una cepa industrial. Se conocen numerosas cepas industriales bacterianas y son adecuadas en la presente invención.
- 35 En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped bacteriana es de la especie *Agrobacterium*, por ejemplo, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* y *A. rubi*. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped bacteriana es de la especie *Arthrobacter*, por ejemplo, *A. aurescens*, *A. citreus*, *A. globiformis*, *A. hydrocarboglutamicus*, *A. mysorens*, *A. nicotianae*, *A. paraffineus*, *A. protophonniae*, *A. roseoparaffinus*, *A. sulfureus* y *A. ureafaciens*. En algunas realizaciones de la invención, la célula huésped bacteriana es de la especie *Bacillus*, por ejemplo, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. lentus*, *B. circulans*, *B. pumilus*, *B. lautus*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. firmus*, *B. alkaophilus*, *B. licheniformis*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus*, *B. halodurans* y *B. amyloliquefaciens*. En realizaciones particulares, la célula huésped será una cepa de *Bacillus* industrial que incluye, pero no se limita a, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. clausii*, *B. stearothermophilus* y *B. amyloliquefaciens*. Algunas realizaciones de una célula huésped de *Bacillus* incluyen *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus* y *B. amyloliquefaciens*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Clostridium*, por ejemplo, *C. acetobutylicum*, *C. tetani E88*, *C. lituseburense*, *C. saccharobutylicum*, *C. perfringens*, *C. thermocellum* y *C. beijerinckii*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Corynebacterium*, por ejemplo, *C. glutamicum* y *C. acetooacidophilum*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Erwinia*, por ejemplo, *E. uredovora*, *E. carotovora*, *E. ananas*, *E. herbicola*, *E. punctata* y *E. terreus*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Pantoea*, por ejemplo, *P. citrea* y *P. agglomerans*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Pseudomonas*, por ejemplo, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. mevalonii* y *P. sp. D-01 10*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Streptococcus*, por ejemplo, *S. equisimiles*, *S. pyogenes* y *S. uberis*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Streptomyces*, por ejemplo, *S. ambofaciens*, *S. achromogenes*, *S. avermitilis*, *S. coelicolor*, *S. aureofaciens*, *S. aureus*, *S. fungicidicus*, *S. griseus* y *S. lividans*. En algunas realizaciones, la célula huésped bacteriana es de la especie *Zymomonas*, por ejemplo, *Z. mobilis* y *Z. lipolytica*.
- 65

Cepas que pueden usarse en la práctica de la invención que incluyen tanto cepas procariotas como eucariotas están fácilmente accesibles al público de varias colecciones de cultivos tales como Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Colección de Cultivos de Patente del Servicio de Investigación Agrícola, Centro de Investigación Regional Norte (NRRL).

Las células huésped pueden modificarse genéticamente para tener características que mejoran la secreción de proteínas, estabilidad de proteínas u otras propiedades deseables para la expresión y/o secreción de una proteína. Por ejemplo, la inactivación de la función de Alp1 produce una célula que es deficiente en proteasa. La inactivación de la función de pyr5 produce una célula con un fenotipo deficiente en pirimidina. En realizaciones particulares, las células huésped se modifican para delecionar secuencias codificantes de proteína celulasa endógena o de otro modo eliminar la expresión de una o más celulasas endógenas. En una realización, la expresión de una o más celulasas endógenas se inhibe para aumentar la producción de celulasas de interés. La modificación genética puede lograrse por técnicas de ingeniería genética o usando técnicas microbiológicas clásicas tales como mutagénesis química o UV y posterior selección. Puede usarse una combinación de modificación recombinante y técnicas de selección clásicas para producir el organismo de interés. Usando tecnología recombinante, las moléculas de ácidos nucleicos pueden introducirse, delecionarse, inhibirse o modificarse, de un modo que se produce elevado rendimiento de β -glucosidasa dentro del organismo o en el cultivo. Por ejemplo, la inactivación de la función de Alp1 produce una célula que es deficiente en proteasa. La inactivación de la función de pyr5 produce una célula con un fenotipo deficiente en pirimidina. En un enfoque de ingeniería genética, la recombinación homóloga puede usarse para inducir modificaciones de genes elegidas como diana eligiendo específicamente como diana un gen *in vivo* para suprimir la expresión de la proteína codificada. En un enfoque alternativo puede usarse ARNip, antisentido o tecnología de ribozimas para inhibir la expresión génica

Transformación y cultivo

La introducción de un vector o construcción de ADN en una célula huésped puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, electroporación u otras técnicas comunes (véase Davis y col., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, que se incorpora en el presente documento por referencia).

Las células huésped manipuladas pueden cultivarse en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar el polinucleótido de β -glucosidasa. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Como se observa, muchas referencias están disponibles para el cultivo y la producción de muchas células, que incluyen células de origen bacteriano, de planta, animal (especialmente de mamífero) y arqueobacteriano. Véanse por ejemplo, Sambrook, Ausubel y Berger (todos arriba), además de Freshney (1994) Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, tercera edición, Wiley-Liss, Nueva York, y las referencias citadas en su interior; Doyle y Griffiths (1997) Mammalian Cell Culture: Essential Techniques, John Wiley and Sons, NY; Humason (1979) Animal Tissue Techniques, cuarta edición W.H. Freeman y Company; y Ricciardelli y col., (1989) In vitro Cell Dev. Biol. 25:1016-1024, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Para cultivo y regeneración de células de planta, Payne y col. (1992) Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems, John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.; Gamborg y Phillips (eds.) (1995) Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York); Jones, ed. (1984) Plant Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey y Plant Molecular Biology (1993) R.R.D.Croy, Ed. Bios Scientific Publishers, Oxford, U.K. ISBN 0 12 198370 6, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Medios de cultivo celular en general se exponen en Atlas y Parks (eds.) The Handbook of Microbiological Media (1993) CRC Press, Boca Raton, FL, que se incorpora en el presente documento por referencia. Información adicional para el cultivo celular se encuentra en bibliografía comercial disponible tal como the Life Science Research Cell Culture Catalogue (1998) de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Mo.) ("Sigma-LSRCCC") y, por ejemplo, the Plant Culture Catalogue y suplemento (1997), también de Sigma-Aldrich, Inc (St. Louis, Mo.) ("Sigma-PCCS"), todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

En algunas realizaciones, las células que expresan los polipéptidos de β -glucosidasa de la invención se cultivan bajo condiciones de fermentación discontinuas o continuas. La fermentación discontinua clásica es un sistema cerrado en el que las composiciones del medio se ponen al principio de la fermentación y no se someten a alternancias artificiales durante la fermentación. Una variación del sistema discontinuo es una fermentación por lotes alimentados que también encuentra uso en la presente invención. En esta variación, el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas por lotes alimentados son útiles cuando es probable la represión de catabolitos para inhibir el metabolismo de las células y si se desea tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. Las fermentaciones discontinuas y por lotes alimentados son comunes y muy conocidas en la técnica. La fermentación continua es un sistema abierto en el que un medio de fermentación definido se añade continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se elimina simultáneamente para el procesamiento. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una alta densidad constante en la que las células están principalmente en crecimiento de fase logarítmica. Los sistemas de fermentación continuos luchan por mantener

condiciones de crecimiento en estado estacionario. Los procedimientos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para los procedimientos de fermentación continua, además de técnicas para maximizar la velocidad de formación de productos, son muy conocidos en la técnica de la microbiología industrial.

5 También pueden emplearse sistemas de transcripción/traducción sin células para producir polipéptidos de β -glucosidasa usando los polinucleótidos de la presente invención. Varios de tales sistemas están comercialmente disponibles. Una guía general para los protocolos de transcripción y traducción *in vitro* se encuentra en Tymms (1995) *In vitro Transcription and Translation Protocols: Methods in Molecular Biology*, volumen 37, Garland Publishing, NY, que se incorpora en el presente documento por referencia.

10

V. PRODUCCIÓN Y RECUPERACIÓN DE POLIPÉPTIDOS DE β -GLUCOSIDASA

La presente invención también se refiere a un procedimiento de preparación de un polipéptido que tiene actividad de β -glucosidasa, comprendiendo el procedimiento proporcionar una célula huésped transformada con uno cualquiera de los polinucleótidos de β -glucosidasa descritos de la presente invención; cultivar la célula huésped transformada en un medio de cultivo en condiciones en las que la célula huésped exprese el polipéptido de β -glucosidasa codificado; y opcionalmente recuperar o aislar el polipéptido de β -glucosidasa expresado, o recuperar o aislar el medio de cultivo que contiene el polipéptido de β -glucosidasa expresado. El procedimiento proporciona además opcionalmente lisar las células huésped transformadas después de expresar el polipéptido de β -glucosidasa codificado y opcionalmente recuperar o aislar el polipéptido de β -glucosidasa expresado del lisado celular. La presente invención proporciona además un procedimiento de preparación de un polipéptido de β -glucosidasa, comprendiendo dicho procedimiento cultivar una célula huésped transformada con un polinucleótido de β -glucosidasa en condiciones adecuadas para la producción del polipéptido de β -glucosidasa y recuperar el polipéptido de β -glucosidasa.

25

Normalmente, la recuperación o aislamiento del polipéptido de β -glucosidasa es del medio de cultivo de células huésped, la célula huésped o ambos, usando técnicas de recuperación de proteínas que son muy conocidas en la técnica, que incluyen aquellas descritas en el presente documento. Las células se recogen normalmente por centrifugación, se alteran por medios físicos o químicos, y el extracto en bruto resultante puede retenerse para la posterior purificación. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden alterarse por cualquier procedimiento conveniente, que incluye ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica o uso de agentes de lisado celular, u otros procedimientos, que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

35 El polipéptido resultante puede recuperarse/aislarse y purificarse opcionalmente por distintos procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede aislarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, interacción hidrófoba, cromatoenfoco y exclusión por tamaño), o precipitación. Las etapas de plegamiento de proteínas pueden usarse, según se desee, en completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) puede emplearse en las etapas de purificación finales. La purificación de BGL1 se describe en Parry y col., 2001, *Biochem. J.* 353:117, y Hong y col., 2007, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:1331, ambos incorporados en el presente documento por referencia. Además de las referencias anotadas anteriormente, una variedad de procedimientos de purificación son muy conocidos en la técnica, que incluyen, por ejemplo, aquellos expuestos en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; Bollag y col. (1996) *Protein Methods*, 2ª edición, Wiley-Liss, NY; Walker (1996) *The Protein Protocols Handbook* Humana Press, NJ; Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Harris y Angal *Protein Purification Methods: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford, Oxford, Inglaterra; Scopes (1993) *Protein Purification: Principles and Practice* 3ª edición, Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998) *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, segunda edición, Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM*, Humana Press, NJ, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Pueden usarse procedimientos inmunológicos para purificar polipéptidos de β -glucosidasa. En un enfoque, el anticuerpo producido contra los polipéptidos de β -glucosidasa (por ejemplo, contra un polipéptido que comprende SEC ID N°: 2 o un fragmento inmunogénico del mismo) usando procedimientos convencionales se inmoviliza sobre perlas, se mezcla con medios de cultivo celular en condiciones en las que se una la β -glucosidasa y se precipita. En un enfoque relacionado se usa inmunocromatografía.

60 Como se observa, en algunas realizaciones la β -glucosidasa se expresa como una proteína de fusión que incluye una porción de no enzima. En algunas realizaciones, la secuencia de β -glucosidasa está fusionada con un dominio que facilita la purificación. Como se usa en el presente documento, el término "dominio que facilita la purificación" se refiere a un dominio que media en la purificación del polipéptido con el que está fusionado. Dominios de purificación adecuados incluyen péptidos quelantes metálicos, módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, una secuencia que se une a glutatión (por ejemplo, GST), una marca de hemaglutinina (HA) (correspondiente a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la gripe; Wilson y col., 1984, *Cell* 37:767), secuencias de proteínas de unión a maltosa, el epítipo FLAG utilizado en el sistema de purificación por

65

extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle, WA), y similares. La inclusión de una secuencia de ligador de polipéptido escindible por proteasa entre el dominio de purificación y el polipéptido HDDH es útil para facilitar la purificación. Un vector de expresión contemplado para su uso en las composiciones y procedimientos descritos en el presente documento proporciona la expresión de una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la invención fusionado con una región de polihistidina separada por un sitio de escisión de enterocinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación sobre IMIAC (cromatografía de afinidad por ión metálico inmovilizado, como se describe en Porath y col., 1992, Protein Expression and Purification 3:263-281) mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para separar el polipéptido HDDH de la proteína de fusión. También pueden usarse vectores pGEX (Promega; Madison, Wis.) para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente de células lisadas por adsorción a perlas de ligando-agarosa (por ejemplo, glutatión-agarosa en el caso de fusiones GST), seguido de elución en presencia de ligando libre.

VI. PROCEDIMIENTOS DE USO DE POLIPÉPTIDOS DE β -GLUCOSIDASA Y CÉLULAS QUE EXPRESAN POLIPÉPTIDOS DE β -GLUCOSIDASA

Como se ha descrito arriba, los polipéptidos de β -glucosidasa de la presente invención pueden usarse para catalizar la hidrólisis de un dímero de azúcar con la liberación del monómero de azúcar correspondiente, por ejemplo, la conversión de celobiosa con la liberación de glucosa. Así, la presente invención proporciona un procedimiento para producir glucosa, (a) proporcionando una celobiosa; y (b) poniendo en contacto la celobiosa con un polipéptido de β -glucosidasa de la invención en condiciones suficientes para formar una mezcla de reacción para convertir la celobiosa en glucosa. El polipéptido de β -glucosidasa puede utilizarse en tales procedimientos en o bien forma aislada o bien como parte de una composición, tal como cualquiera de aquellas descritas en el presente documento. El polipéptido de β -glucosidasa también puede proporcionarse en medios de cultivo de células o en un lisado celular. Por ejemplo, después de producir el polipéptido de β -glucosidasa cultivando una célula huésped transformada con un polinucleótido de β -glucosidasa o vector de la presente invención, la β -glucosidasa no necesita aislarse del medio de cultivo (es decir, si la β -glucosidasa es secretada en el medio de cultivo) o lisado celular (es decir, si la β -glucosidasa no es secretada en el medio de cultivo) o se usa en forma purificada para ser útil en otros procedimientos de uso del polipéptido de β -glucosidasa. Cualquier composición, medio de cultivo celular o lisado celular que contenga un polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención puede ser adecuado para uso en procedimientos que utilicen una β -glucosidasa. Por tanto, la presente invención proporciona además un procedimiento para producir glucosa: (a) proporcionando una celobiosa; y (b) poniendo en contacto la celobiosa con un medio de cultivo o lisado celular o composición que comprende un polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención en condiciones suficientes para formar una mezcla de reacción para convertir la celobiosa en glucosa.

La presente invención proporciona además composiciones que son útiles para la conversión enzimática de celobiosa en glucosa. Por ejemplo, uno o más polipéptidos de β -glucosidasa de la presente invención pueden combinarse con otra enzima y/o un agente que altera las propiedades de manipulación del material a granel o procesabilidad adicional de la(s) β -glucosidasa(s) (por ejemplo, un agente de ayuda del flujo, agua, tampón, un tensioactivo y similares) o que mejora la eficiencia de la conversión de celobiosa en glucosa, como se describe en más detalle en el presente documento más adelante. La otra enzima puede ser una β -glucosidasa diferente u otra enzima celulasa.

Mezclas de enzimas

En otro aspecto, la invención proporciona una mezcla de enzimas que comprende un polipéptido de variante de Bgl1 C1 como se describe en el presente documento. La mezcla de enzimas puede estar libre de células, o en realizaciones alternativas, puede no separarse de células huésped que secretan un componente de mezcla de enzimas. Una mezcla de enzimas libre de células normalmente comprende enzimas que se han separado de cualquier célula. Las mezclas de enzimas libres de células pueden prepararse por cualquiera de una variedad de metodologías que se conocen en la técnica, tales como metodologías de filtración o centrifugación. En ciertas realizaciones, la mezcla de enzimas puede estar, por ejemplo, parcialmente libre de células, sustancialmente libre de células o completamente libre de células.

La variante de Bgl1 C1 y cualquier enzima adicional presente en la mezcla de enzimas puede secretarse de una única célula fúngica genéticamente modificada o por diferentes microbios en fermentaciones combinadas o separadas. Similarmente, la variante de Bgl1 C1 y cualquier enzima adicional presente en la mezcla de enzimas puede expresarse individualmente o en sub-grupos de las diferentes cepas de diferentes organismos y combinarse las enzimas *in vitro* para preparar la mezcla de enzimas. También se contempla que la variante de Bgl1 C1 y cualquier enzima adicional en la mezcla de enzimas pueda expresarse individualmente o en sub-grupos de diferentes cepas de un único organismo, y combinarse las enzimas para preparar la mezcla de enzimas. En algunas realizaciones, todas las enzimas se expresan a partir de un único organismo huésped, tal como la célula fúngica genéticamente modificada.

En algunas realizaciones, la mezcla de enzimas comprende otros tipos de celulasas, seleccionadas de celulasa CBH, EG y BG. En algunas realizaciones, la celobiohidrolasa es celobiohidrolasa II de *T. reesei*. En algunas realizaciones, la endoglucanasa comprende un dominio catalítico derivado del dominio catalítico de una

endoglucanasa de *Streptomyces avermitilis*. Véase la solicitud pendiente de tramitación nº 12/751.985 incorporada en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones, la al menos un celulasa es *Acidothermus cellulolyticus*, *Termobifida fusca*, *Humicola grisea* o *Chrysosporium* sp. Las enzimas celulasas de la mezcla de celulasa funcionan juntas produciendo la desicristalización e hidrólisis de la celulosa de un sustrato de biomasa para dar azúcares solubles tales como, pero no se limitan a, glucosa (véanse Brigham y col., 1995, en Handbook on Bioethanol (C. Wyman ed.) pág. 119-141, Taylor y Francis, Washington DC, que se incorpora en el presente documento por referencia).

Se conocen mezclas de celulasas para la eficiente hidrólisis enzimática de celulosa (véase, por ejemplo, Viikari y col., 2007, "Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis" Adv Biochem Eng Biotechnol 108:121-45, y publicaciones de patente de EE.UU. US 2009/0061484; US 2008/0057541; y US 2009/0209009 a logen Energy Corp.), cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia para todos los fines. En algunas realizaciones, las mezclas de enzimas que se producen naturalmente o recombinantes purificadas se combinan con materia prima celulósica o un producto de la hidrólisis de celulosa. Alternativamente o además, una o más poblaciones de células, cada una de las cuales produce una o más celulasas que se producen naturalmente o recombinantes, pueden combinarse con materia prima celulósica o un producto de la hidrólisis de celulosa.

Un polipéptido de β -glucosidasa de variante de la invención también puede estar presente en mezclas con enzimas distintas de celulasas que degradan celulosa, hemicelulosa, pectina y/o lignocelulosa.

Una "hemicelulasa", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que puede catalizar la hidrólisis de hemicelulosa en pequeños polisacáridos tales como oligosacáridos, o sacáridos monoméricos. Las hemicelulasas incluyen xilano, glucuronoxilano, arabinoxilano, glucomanano y xiloglucano. Las hemicelulasas incluyen, por ejemplo, las siguientes: endoxilanasas, β -xilosidasas, α -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, feruloil esterases, cumaroil esterases, α -galactosidasas, β -galactosidasas, β -mananasas y β -manosidasas. Por tanto, una mezcla de enzimas puede comprender una variante de β -glucosidasa de la invención y una o más hemicelulasas.

Una endoxilanasas (EC 3.2.1.8) cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-xilosídicos en xilanos. Esta enzima también puede denominarse endo-1,4- β -xilanasas o 1,4- β -D-xilano xilano hidrolasa. Una alternativa es EC 3.2.1.136, una glucuronoarabinoxilano endoxilanasas, una enzima que puede hidrolizar enlaces 1,4-xilosídicos en glucuronoarabinoxilanos.

Una β -xilosidasa (EC 3.2.1.37) cataliza la hidrólisis de 1,4- β -D-xilanos, para eliminar residuos de D-xilosa sucesivos de los extremos no reductores. Esta enzima también puede denominarse xilano 1,4- β -xilosidasa, 1,4- β -D-xilano xilohidrolasa, exo-1,4- β -xilosidasa o xilobiasa.

Una α -L-arabinofuranosidasa (EC 3.2.1.55) cataliza la hidrólisis de residuos de alfa-L-arabinofuranósido no reductores terminales en alfa-L-arabinósidos. La enzima actúa sobre alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contienen enlaces (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos y arabinogalactanos. La alfa-L-arabinofuranosidasa también se conoce como arabinosidasas, alfa-arabinosidasas, alfa-L-arabinosidasas, alfa-arabinofuranosidasas, arabinofuranosidasas, polisacárido alfa-L-arabinofuranosidasas, alfa-L-arabinofuranósido hidrolasa, L-arabinosidasas y alfa-L-arabinanasas.

Una alfa-glucuronidasa (EC 3.2.1.139) cataliza la hidrólisis de un alfa-D-glucuronósido en D-glucuronato y un alcohol.

Una acetilxilanesterasa (EC 3.1.1.72) cataliza la hidrólisis de grupos acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de alfa-naftilo y acetato de p-nitrofenilo.

Una feruloil esterasa (EC 3.1.1.73) tiene actividad de 4-hidroxi-3-metoxicinamoil-azúcar hidrolasa (EC 3.1.1.73) que cataliza la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en sustratos "naturales", para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato). La feruloil esterasa también se conoce como ácido ferúlico esterasa, hidroxicinamoil esterasa, FAE-III, cinamoil éster hidrolasa, FAEA, cinAE, FAE-I o FAE-II.

Una cumaroil esterasa (EC 3.1.1.73) cataliza una reacción de la forma: cumaroil-sacárido + H₂O = cumarato + sacárido. El sacárido puede ser, por ejemplo, un oligosacárido o un polisacárido. Esta enzima también puede denominarse trans-4-cumaroil esterasa, trans-p-cumaroil esterasa, p-cumaroil esterasa o ácido p-cumárico esterasa. La enzima también se encuentra dentro de EC 3.1.1.73, así que también puede denominarse una feruloil esterasa.

Una α -galactosidasa (EC 3.2.1.22) cataliza la hidrólisis de residuos de α -D-galactosa no reductores terminales en α -D-galactósidos, que incluyen oligosacáridos de galactosa, galactomananos, galactanos y arabinogalactanos. Esta enzima también puede denominarse melibiasa.

Una β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) cataliza la hidrólisis de residuos de β -D-galactosa no reductores terminales en β -

D-galactósidos. Un polipéptido tal también puede ser capaz de hidrolizar α -L-arabinósidos. Esta enzima también puede denominarse exo-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactanasa o lactasa.

Una β -mananasa (EC 3.2.1.78) cataliza la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- β -D-manosídicos en mananos, galactomananos y glucomananos. Esta enzima también puede denominarse manano endo-1,4- β -manosidasa o endo-1,4-mananasa.

Una β -manosidasa (EC 3.2.1.25) cataliza la hidrólisis de residuos de β -D-manosa no reductores terminales en β -D-manósidos. Esta enzima también puede denominarse mananasa o manasa.

También pueden incluirse una o más enzimas que degradan pectina en una mezcla de enzimas que comprende una variante de β -glucosidasa de la invención. Una pectinasa cataliza la hidrólisis de pectina en unidades más pequeñas tales como oligosacárido o sacáridos monoméricos. Una mezcla de enzimas puede comprender cualquier pectinasa, por ejemplo, una endo- poligalacturonasa, una pectina metil esterasa, una endo-galactanasa, una pectina acetil esterasa, una endo-pectina liasa, pectato liasa, alfa ramnosidasa, una exo-galacturonasa, una exo-poligalacturonato liasa, una ramnogalacturonano hidrolasa, una ramnogalacturonano liasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa o una xilogalacturonasa.

Una endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) cataliza la hidrólisis al azar de enlaces 1,4- α -D-galactosidurónicos en pectato y otros galacturonanos. Esta enzima también puede denominarse poligalacturonasa pectina depolimerasa, pectinasa, endopoligalacturonasa, pectolasa, pectina hidrolasa, pectina poligalacturonasa, poli- α -1,4-galacturónido glicanohidrolasa, endogalacturonasa; endo-D-galacturonasa o poli(1,4- α -D-galacturónido) glicanohidrolasa.

Una pectina metil esterasa (EC 3.1.1.11) cataliza la reacción: pectina + n H₂O = n metanol + pectato. La enzima también puede conocerse como pectina esterasa, pectina demetoxilasa, pectina metoxilasa, pectina metilestera, pectasa, pectinoestera o pectina pectilhidrolasa.

Una endo-galactanasa (EC 3.2.1.89) cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4- β -D-galactosídicos en arabinogalactanos. La enzima también puede conocerse como arabinogalactano endo-1,4- β -galactosidasa, endo-1,4- β -galactanasa, galactanasa, arabinogalactanasa o arabinogalactano 4- β -D-galactanohidrolasa.

Una pectina acetil esterasa cataliza la desacetilación de los grupos acetilo en los grupos hidroxilo de los residuos GalUA de pectina.

Una endo-pectina liasa (EC 4.2.2.10) cataliza la escisión eliminativa de (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano metil éster para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi-6-O-metil- α -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede conocerse como pectina liasa, pectina trans-eliminasa; endo-pectina liasa, transeliminasa polimetilgalacturónica, pectina metiltranseliminasa, pectoliasa, PL, PNL o PMGL o (1 \rightarrow 4)-6-O-metil- α -D-galacturonano liasa.

Una pectato liasa (EC 4.2.2.2) cataliza la escisión eliminativa de (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano para dar oligosacáridos con grupos 4-desoxi- α -D-galact-4-enuronosilo en sus extremos no reductores. La enzima también puede conocerse como transeliminasa poligalacturónica, ácido péptico transeliminasa, poligalacturonato liasa, endopeptina metiltranseliminasa, pectato transeliminasa, endogalacturonato transeliminasa, ácido péptico liasa, liasa péptica, ácido α -1,4-D-endopoligalacturónico liasa, PGA liasa, PPasa-N, ácido endo- α -1,4-poligalacturónico liasa, ácido poligalacturónico liasa, pectina trans-eliminasa, ácido poligalacturónico trans-eliminasa o (1 \rightarrow 4)- α -D- galacturonano liasa.

Una alfa ramnosidasa (EC 3.2.1.40) cataliza la hidrólisis de residuos de α -L-ramnosa no reductores terminales en α -L-ramnósidos o alternativamente en ramnogalacturonano. Esta enzima también puede conocerse como α -L-ramnosidasa T, α -L-ramnosidasa N o α -L-ramnósido ramnoidrolasa.

Una exo-galacturonasa (EC 3.2.1.82) hidroliza ácido péptico del extremo no reductor, que libera digalacturonato. La enzima también puede conocerse como exo-poli- α -galacturonosidasa, exopoligalacturonosidasa o exopoligalacturonosidasa.

Una exo-galacturonasa (EC 3.2.1.67) cataliza una reacción del siguiente tipo: (1,4- α -D-galacturónido)_n + H₂O = (1,4- α -D-galacturónido)_{n-i} + D-galacturonato. La enzima también puede conocerse como galacturano 1,4- α -galacturonidasa, exopoligalacturonasa, poli(galacturonato) hidrolasa, exo-D-galacturonasa, exo-D-galacturonanasa, exopoli-D-galacturonasa o poli(1,4- α -D-galacturónido) galacturonohidrolasa.

Una exopoligalacturonato liasa (EC 4.2.2.9) cataliza la escisión eliminativa de 4-(4-desoxi- α -D-galact-4-enuronosil)-D-galacturonato del extremo reductor de pectato, es decir, pectina desesterificada. Esta enzima puede conocerse como pectato disacárido-liasa, pectato exoliasa, ácido exopéptico transeliminasa, exopectato liasa, ácido exopoligalacturónico-trans-eliminasa, PATE, exo-PATE, exo-PGL o disacárido-liasa del extremo reductor de (1 \rightarrow 4)- α -D-galacturonano.

- 5 Un ramnogalacturonano hidroliza el enlace entre ácido galactosilurónico y ramnopiranosilo en un modo endo en estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes que consisten en el disacárido [ácido (1,2-alfa-L-ramnoil-(1,4)-alfa-galactosilurónico).
- Una ramnogalacturonano liasa escinde enlaces α -L-Rhap-(1 \rightarrow 4)- α -D-GalpA en un modo endo en ramnogalacturonano por beta-eliminación.
- Una ramnogalacturonano acetil esterasa cataliza la desacetilación del esqueleto de ramnosa alternante y residuos de ácido galacturónico en ramnogalacturonano.
- Una ramnogalacturonano galacturonohidrolasa hidroliza ácido galacturónico del extremo no reductor de estructuras de ramnogalacturonano estrictamente alternantes en un modo exo. Esta enzima también puede conocerse como xilogalacturonano hidrolasa.
- Una endo-arabinanasa (EC 3.2.1.99) cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,5- α -arabinofuranosídicos en 1,5-arabinanos. La enzima también puede conocerse como endo-arabinasa, arabinano endo-1,5- α -L-arabinosidasa, endo-1,5- α -L-arabinanasa, endo- α -1,5-arabanasa; endo-arabanasa o 1,5- α -L-arabinano 1,5- α -L-arabinanohidrolasa.
- 20 Uno o más enzimas que participan en la degradación de lignina también pueden incluirse en una mezcla de enzimas que comprende una variante de β -glucosidasa de la invención. La despolimerización de lignina enzimática puede llevarse a cabo por lignina peroxidasas, manganeso peroxidasas, lacasas y celobiosa deshidrogenasas (CDH), trabajando frecuentemente en sinergia. Estas enzimas extracelulares se denominan frecuentemente enzimas modificadoras de lignina o LME. Tres de estas enzimas comprenden dos peroxidasas que contienen hemo glucosiladas: lignina peroxidasa (LiP); peroxidasa dependiente de Mn (MnP); y, una fenoloxidasa lacasa que contiene cobre (LCC).
- 25 Lacasa. Las lacasas son enzimas oxidasas que contienen cobre que se encuentran en muchas plantas, hongos y microorganismos. Las lacasas son enzimáticamente activas en fenoles y moléculas similares y realizan una oxidación de un electrón. Las lacasas pueden ser poliméricas y la forma enzimáticamente activa puede ser un dímero o trímero.
- 30 Peroxidasa dependiente de Mn. La actividad enzimática de peroxidasa dependiente de Mn (MnP) depende de Mn²⁺. Sin quedar ligado a teoría, se ha sugerido que la función principal de esta enzima es oxidar Mn²⁺ a Mn³⁺ (Glenn y col. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 251:688-696). Posteriormente, los sustratos fenólicos se oxidan por el Mn³⁺ generado.
- 35 Lignina peroxidasa. La lignina peroxidasa es un hemo extracelular que cataliza la despolimerización oxidativa de disoluciones diluidas de lignina polimérica *in vitro*. Algunos de los sustratos de LiP, más en particular alcohol 3,4-dimetoxibencílico (alcohol veratrílico, VA), son compuestos rédox activos que se ha mostrado que actúan de mediadores rédox. El VA es un metabolito secundario producido al mismo tiempo que LiP por cultivos ligninolíticos de *P. chrysosporium* y, sin quedar ligado a teoría, se ha propuesto que funciona como un mediador rédox fisiológico en la oxidación catalizada por LiP de lignina *in vivo* (Harvey y col. (1986) FEBS Lett. 195, 242-246).
- 40 Una mezcla enzimática que comprende una variante de β -glucosidasa de la invención puede comprender además al menos una de las siguientes; una proteasa o una lipasa que participa en la degradación de celulosa.
- 45 “Proteasa” incluye enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos (peptidasas), además de enzimas que hidrolizan enlaces entre péptidos y otros restos, tales como azúcares (glicopeptidasas). Muchas proteasas se caracterizan bajo EC 3.4, y son adecuadas para su uso en la invención. Algunos tipos específicos de proteasas incluyen cisteína proteasas que incluyen pepsina, papaína y serina proteasas que incluyen quimotripsinas, carboxipeptidasas y metaloendopeptidasas.
- 50 “Lipasa” incluye enzimas que hidrolizan lípidos, ácidos grasos y acilglicéridos, que incluyen fosfoglicéridos, lipoproteínas, diacilglicérols y similares. En plantas, los lípidos se usan como componentes estructurales para limitar la pérdida de agua e infección por patógenos. Estos lípidos incluyen ceras derivadas de ácidos grasos, además de cutina y suberina.
- 55 Una mezcla de enzimas que comprende una variante de β -glucosidasa de la invención también puede comprender al menos una expansina o proteína similar a expansina tal como una swolenina (véase Salheimo y col., Eur. J. Biochem. 269, 4202-4211, 2002) o una proteína similar a swolenina.
- 60 Las expansinas participan en la relajación de la estructura de la pared celular durante el crecimiento celular de plantas. Se ha propuesto que las expansinas alteran el enlace de hidrógeno entre celulosa y otros polisacáridos de la pared celular sin tener actividad hidrolítica. De esta forma, se cree que permiten el deslizamiento de las fibras de celulosa y el alargamiento de la pared celular. La swolenina, una proteína similar a expansina, contiene un dominio
- 65

de la familia 1 del módulo de unión a hidrato de carbono (CBD) del extremo N y un dominio similar a expansina del extremo C. Para los fines de la presente invención, una proteína similar a expansina o proteína similar a swollenina puede comprender uno o ambos de tales dominios y/o puede alterar la estructura de paredes celulares (tal como alterar la estructura de celulosa), opcionalmente sin producir cantidades detectables de azúcares reductores.

Una mezcla de enzimas que comprende una variante de β -glucosidasa de la invención también puede comprender al menos uno de los siguientes: un producto de polipéptido de una proteína integrante de celulosa, escafoldina o una proteína similar a escafoldina, por ejemplo, CipA o CipC de *Clostridium thermocellum* o *Clostridium cellulolyticum*, respectivamente. Las escafoldinas y proteínas integrantes de celulosa son subunidades integrantes multifuncionales que pueden organizar subunidades celolíticas en un complejo multienzimático. Esto se lleva a cabo por la interacción de dos clases complementarias de dominio, es decir, un dominio de cohesión sobre escafoldina y un dominio de dockerina sobre cada unidad enzimática. La subunidad de escafoldina también lleva un módulo de unión a celulosa que media en la unión del celulosoma a su sustrato. Una escafoldina o proteína integrante de celulosa para los fines de la presente invención puede comprender uno o ambos de tales dominios.

Una mezcla de enzimas que comprende una variante de β -glucosidasa de la invención también puede comprender al menos una proteína inducida por celulosa o proteína modulante, por ejemplo, como se codifica por el gen cip1 o cip2 o genes similares de *Trichoderma reesei* (véase Foreman y col., J. Biol. Chem. 278(34), 31988-31997, 2003).

Una mezcla de enzimas que comprende una variante de β -glucosidasa de la invención puede comprender un miembro de cada una de las clases de los polipéptidos descritos anteriormente, varios miembros de una clase de polipéptidos, o cualquier combinación de estas clases de polipéptidos.

Otros componentes de composiciones de β -glucosidasa

Los polipéptidos de β -glucosidasa de la presente invención pueden usarse en combinación con otros componentes opcionales tales como un tampón, un tensioactivo y/o un agente de rastreo. Un tampón puede usarse con un polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención (opcionalmente combinado con otras celulasas, que incluyen otra β -glucosidasa) para mantener un pH deseado dentro de la disolución en la que se emplea la β -glucosidasa. La concentración exacta de tampón empleada dependerá de varios factores que el experto puede determinar. Tampones adecuados son muy conocidos en la técnica. Un tensioactivo puede usarse adicionalmente en combinación con las celulasas de la presente invención. Tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo compatible con la β -glucosidasa y, opcionalmente, con cualquier otra celulasa que se use. Tensioactivos a modo de ejemplo incluyen tensioactivos aniónicos, no iónicos y anfólicos.

Tensioactivos aniónicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, alquilbencenosulfonatos lineales o ramificados; étersulfatos de alquilo o alqueno que tienen grupos alquilo o grupos alqueno lineales o ramificados; sulfatos de alquilo o alqueno; olefinsulfonatos; alcanosulfonatos, y similares. Contraiones adecuados para tensioactivos aniónicos incluyen, por ejemplo, iones de metales alcalinos tales como sodio y potasio; iones de metales alcalinotérreos tales como calcio y magnesio; ión amonio; y alcanolaminas que tienen de 1 a 3 grupos alcohol de número de carbono 2 ó 3. Tensioactivos anfólicos adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, sulfonatos de sal de amonio cuaternario, tensioactivos anfólicos tipo betaína y similares. Tensioactivos no iónicos adecuados incluyen generalmente éteres de polioxalqueno, además de alcanolamidas de ácidos grasos superiores o aducto de óxido de alqueno de las mismas, monoésteres de glicerina de ácidos grasos y similares. También pueden emplearse mezclas de tensioactivos como se conoce en la técnica.

Producción de azúcares solubles de biomasa celulósica

Los polipéptidos de β -glucosidasa de la presente invención, además de cualquier composición, medio de cultivo o lisado celular que comprenda tales polipéptidos de β -glucosidasa, pueden usarse en la producción de monosacáridos, disacáridos u oligómeros de un mono- o di-sacárido como materia prima química o de fermentación de biomasa. Como se usa en el presente documento, el término "biomasa" se refiere a material biológico vivo o muerto que contiene un sustrato de polisacárido tal como, por ejemplo, celulosa, almidón, y similares. Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de conversión de un sustrato de biomasa en un azúcar fermentable, comprendiendo el procedimiento poner en contacto un medio de cultivo o lisado celular que contiene un polipéptido de β -glucosidasa según la invención con el sustrato de biomasa en condiciones adecuadas para la producción del azúcar fermentable. La presente invención proporciona además un procedimiento de conversión de un sustrato de biomasa en un azúcar soluble (o "fermentable") (a) pretratando un sustrato de celulosa para aumentar su susceptibilidad a la hidrólisis; (b) poniendo en contacto el sustrato de celulosa pretratado de la etapa (a) con una composición, medio de cultivo o lisado celular que contiene un polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención (y opcionalmente otras celulasas) en condiciones adecuadas para la producción del azúcar fermentable.

En algunas realizaciones, la biomasa incluye sustratos celulósicos que contienen celulosa, hemicelulosa, lignocelulosa. Sustratos celulósicos incluyen, pero no se limitan a, que incluyen pero no se limitan a, madera, pulpa de madera, pulpa de papel, hojas y tallos de maíz, fibra de maíz, arroz, residuo de procesamiento de papel y pulpa, plantas leñosas o herbáceas, pulpa de fruta o verdura, grano de destilería, céspedes, cáscara de arroz, paja de trigo,

algodón, cáñamo, lino, sisal, mazorcas de maíz, bagazo de caña de azúcar, césped de pradera y mezclas de los mismos. La biomasa puede pretratarse opcionalmente para aumentar la susceptibilidad de celulosa a la hidrólisis usando procedimientos conocidos en la técnica tales como pretratamientos químicos, físicos y biológicos (por ejemplo, explosión por vapor, reducción a pulpa, molienda, hidrólisis ácida, exposición a disolventes, y similares, además de combinaciones beneficiosas de las mismas). En algunas realizaciones, la biomasa comprende plantas transgénicas que expresan las enzimas ligninasa y/o celulasa que degradan lignina y celulosa. Véase, por ejemplo, el documento US 20080104724, que se incorpora en el presente documento por referencia.

En algunas realizaciones, el polipéptido de β -glucosidasa y las composiciones que contienen polipéptido de β -glucosidasa, medios de cultivo celular y lisados celulares pueden hacerse reaccionar con la biomasa o biomasa pretratada a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 100 °C, aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C, aproximadamente 30 °C a aproximadamente 80 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C y aproximadamente 35 °C a aproximadamente 75 °C. Por tanto, la biomasa puede hacerse reaccionar con los polipéptidos de β -glucosidasa y composiciones que contienen polipéptido de β -glucosidasa, medios de cultivo celular y lisados celulares a una temperatura de aproximadamente 25 °C, a aproximadamente 30 °C, a aproximadamente 35 °C, a aproximadamente 40 °C, a aproximadamente 45 °C, a aproximadamente 50 °C, a aproximadamente 55 °C, a aproximadamente 60 °C, a aproximadamente 65 °C, a aproximadamente 70 °C, a aproximadamente 75 °C, a aproximadamente 80 °C, a aproximadamente 85 °C, a aproximadamente 90 °C, a aproximadamente 95 °C y a aproximadamente 100 °C. Además de las temperaturas descritas anteriormente, condiciones adecuadas para convertir un sustrato de biomasa en un azúcar fermentable que emplean un polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención (opcionalmente en una composición, medio de cultivo celular o lisado celular) incluyen llevar a cabo el procedimiento a un pH en un intervalo de aproximadamente pH 3,0 a aproximadamente 8,5, aproximadamente pH 3,5 a aproximadamente 8,5, aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente 7,5, aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente 7,0 y aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente 6,5. Aquellos expertos habituales en la materia apreciarán que los tiempos de reacción para convertir un sustrato particular de biomasa en un azúcar fermentable pueden variar, pero el tiempo de reacción óptimo puede determinarse fácilmente. Tiempos de reacción a modo de ejemplo pueden estar en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 240 horas, de aproximadamente 5 a aproximadamente 180 h y de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 h. Por ejemplo, el tiempo de incubación puede ser al menos 1 h, al menos 5 h, al menos 10 h, al menos 15 h, al menos 25 h, al menos 50 h, al menos 100 h, al menos 180 y similares.

La reacción de la β -glucosidasa con sustrato de biomasa o sustrato de biomasa pretratado bajo estas condiciones puede producir la liberación de cantidades sustanciales de los azúcares solubles del sustrato. Por ejemplo al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o más azúcar soluble puede estar disponible con respecto a la liberación de azúcar por C1 natural. En algunas realizaciones, la cantidad de azúcar soluble puesta a disposición puede ser al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces o al menos 5 veces superior a la puesta a disposición por C1 natural bajo las mismas condiciones. En algunas realizaciones, los azúcares solubles comprenderán glucosa.

Los azúcares solubles producidos mediante los procedimientos de la presente invención pueden usarse para producir un alcohol (tal como, por ejemplo, etanol, butanol, y similares). Por tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un alcohol, en el que el procedimiento comprende (a) proporcionar un azúcar fermentable producido usando un polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención en los procedimientos descritos arriba; (b) poner en contacto el azúcar fermentable con un microorganismo fermentante para producir el alcohol u otro producto metabólico; y (c) recuperar el alcohol u otro producto metabólico.

En algunas realizaciones, el polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención, o composición, medio de cultivo celular o lisado celular que contiene el polipéptido de β -glucosidasa, puede usarse para catalizar la hidrólisis de un sustrato de biomasa a un azúcar fermentable en presencia de un microorganismo fermentante tal como una levadura (por ejemplo, *Saccharomyces sp.* tal como, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia sp.*, y similares) u otros microorganismos fermentantes C5 o C6 que son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, *Zymomonas sp.*, *E. coli*) para producir un producto final tal como etanol. En un ejemplo se usa un procedimiento de sacarificación y fermentación (SSF) simultánea en el que los azúcares fermentables (por ejemplo, glucosa y/o xilosa) se eliminan del sistema por el procedimiento de fermentación.

Los azúcares solubles producidos por el uso de un polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención también pueden usarse en la producción de otros productos finales tales como, por ejemplo, acetona, un aminoácido (por ejemplo, glicina, lisina y similares), un ácido orgánico (por ejemplo, ácido láctico y similares), glicerol, un diol (por ejemplo, 1,3-propanodiol, butanodiol, y similares) y piensos animales.

Un experto en la materia apreciará fácilmente que las composiciones de polipéptido de β -glucosidasa de la presente invención pueden usarse en forma de una disolución acuosa o un concentrado sólido. Cuando se emplean disoluciones acuosas, la disolución de β -glucosidasa puede diluirse fácilmente para permitir concentraciones precisas. Un concentrado puede estar en cualquier forma reconocida en la materia que incluye, por ejemplo, líquidos, emulsiones, suspensiones, gel, pastas, gránulos, polvos, un aglomerado, un disco sólido, además de otras

formas que son muy conocidas en la técnica. También pueden usarse otros materiales con o incluidos en la composición de β -glucosidasa de la presente invención según se desee, que incluyen piedras, piedra pómez, cargas, disolventes, activadores de enzimas y agentes antirredeposición dependiendo del uso previsto de la composición.

Además del uso para la conversión de biomasa celulósica, los polipéptidos de β -glucosidasa y composiciones de los mismos también pueden usarse en la industria alimentaria y de las bebidas, por ejemplo, en el procedimiento de elaboración de vinos para la eficaz liberación de monoterpenoles (véase, por ejemplo, Yanai y Sato (1999) Am. J. Enol. Eitic., 50:231 - 235, que se incorpora en el presente documento por referencia) y para la preparación de tofu enriquecido en glicona isoflavona (véase, por ejemplo, Mase y col., (2004) J. Appl. Glycosci., 51:211 - 216, que se incorpora en el presente documento por referencia). Los polipéptidos de β -glucosidasa de la presente invención también pueden emplearse en composiciones de detergente para mejorar el rendimiento de limpieza (véanse, por ejemplo, los documentos USP 7.244.605; US 5.648.263 y WO 2004/048592, que se incorporan en el presente documento por referencia).

Lo anterior y otros aspectos de la invención pueden entenderse mejor a propósito de los siguientes ejemplos no limitantes.

VII: EJEMPLOS

Ejemplo 1: Adquisición del gen de β -glucosidasa 1 de C1 natural (Bgl1 C1) y construcción de vectores de expresión

Se sintetizó ADNc de *Bgl1 C1* natural y se verificó la secuencia de ADN. El gen se clonó en un vector lanzadera de *Saccharomyces cerevisiae/C1* pYTDX20 usando sitios de clonación Pml1. El péptido señal y el gen estuvieron bajo el control de un promotor de quitinasa (Pchi). El vector contuvo REP2, rep1 y el origen de replicación de proteína D (parcial) para *S. cerevisiae* y un marcador de resistencia a URA3. El plásmido resultante (pYTDX20-C1 *bgl1*) se transformó en la cepa INVSC1 de *S. cerevisiae*, y las células huésped transformadas se cultivaron en HTP para la producción de proteína Bgl1 C1. Se verificó la secuencia de *Bgl1 C1* de los transformantes. La porción que codifica proteína de la secuencia de ADNc de *Bgl1 C1* natural se proporciona como SEC ID N°: 1 y el polipéptido codificado se proporciona como SEC ID N°: 2. Los 19 primeros residuos de SEC ID N°: 2 se muestran en negrita y comprenden el péptido señal.

Ejemplo 2: Procedimiento en matraz con agitación

Una única colonia de *S. cerevisiae* que contenía un plásmido con el gen de ADNc de *Bgl1 C1* se inoculó en 1 ml de caldo de uracilo definido sintético (SD-ura) (2 g/l de Drop-out sintético menos uracilo sin base nitrogenada de levadura (de United States Biological, Swampscott, MA), 5 g/l de sulfato de amonio, 0,1 g/l de cloruro de calcio, 2 mg/l de inositol, 0,5 g/l de sulfato de magnesio, 1 g/l de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 0,1 g/l de cloruro sódico) que contenía 6 % de glucosa. Las células se cultivaron durante 24 h en una estufa de incubación a 30 °C con agitación a 250 rpm. Entonces, 500 μ l del cultivo durante la noche se diluyeron en 50 ml de medio SD-ura que contenía 2 % de glucosa en un matraz con agitación estéril con deflectores de 250 ml y se incubó a 37 °C durante 48 h. Las células se sedimentaron por centrifugación (4000 rpm, 15 min, 4 °C). El sobrenadante de medio claro que contenía la enzima Bgl1 C1 secretada se recogió y se guardó a -20 °C hasta que se usó.

Ejemplo 3: Ensayos para determinar la actividad de β -glucosidasa

La actividad de β -glucosidasa puede determinarse tanto por un ensayo de para-nitrofenil- β -D-glucósido (pNPG) como un ensayo de celobiosa.

Se usó un ensayo basado en pNPG (p-nitrofenil- β -D-glucopiranosido) colorimétrico para medir la actividad de β -glucosidasa. En un volumen total de 150 μ l, 75 μ l de sobrenadante de medio claro que contenían enzima Bgl1 C1 se añadieron a 75 μ l de disolución de pNPG 3 mM (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) en tampón acetato sódico 300 mM, pH 5. Las reacciones se incubaron a pH 5, 50 °C durante 1,5 h. Después de la reacción, 75 μ l de la mezcla de reacción se inactivaron con 75 μ l de disolución de carbonato sódico 1 M a pH 11. La absorbancia de la disolución se midió a 405 nm para determinar la conversión de pNPG en p-nitrofenilo. La cantidad de producto de p-nitrofenol se midió espectrofotométricamente a 405 nm para calcular la actividad de β -glucosidasa como se describe por Breves y col. (1997), Appl. Environmental Microbiol. 63:3902-3910. La actividad de β -glucosidasa detectable se observó bajo condiciones de selección de alto rendimiento (pH 5, 65 °C).

La actividad de β -glucosidasa también se determinó usando un ensayo de celobiosa, que usó celobiosa (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) como sustrato. En un volumen total de 150 μ l, 75 μ l de sobrenadante de medio claro que contenían enzima Bgl1 C1 se añadieron a 75 μ l de 6,6 g/l de celobiosa en tampón acetato sódico 300 mM (pH 5). La reacción se incubó a 65 °C durante 21 horas con agitación. La producción de glucosa se determinó usando un kit de ensayo de glucosa enzimático (K-GLUC, Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Irlanda). En un volumen total de 200 μ l, 15 μ l de la mezcla de reacción de Bgl1 C1 se añadieron a 185 μ l de reactivo de determinación de glucosa (reactivo GOPOD, suministrado como parte del kit de ensayo de K-GLUC). La reacción se incubó a 50 °C durante 30 minutos

y la absorbancia de la disolución se midió a 510 nm. La enzima glucosa oxidasa en el reactivo GOPOD reacciona con glucosa y produce peróxido de hidrógeno que luego reacciona con 4-aminoantipirina en el reactivo para producir un colorante de quinoneimina. La cantidad de colorante de quinoneimina se midió espectrofotométricamente a 510 nm para calcular la actividad de β -glucosidasa. La conversión de celobiosa a glucosa también se midió usando un Agilent HPLC 1200 equipado con columna de exclusión iónica HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) con agua como eluyente a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min a 80 °C. Los tiempos de retención de la celobiosa y la glucosa fueron 4,7 y 5,8 minutos, respectivamente. La actividad de β -glucosidasa detectable se observó bajo condiciones de selección de alto rendimiento (pH 5, 65 °C).

10 Ejemplo 4: Evaluación de la actividad óptima de Bgl1 C1

El perfil de actividad de Bgl1 C1 nativa se investigó a diferentes temperaturas (50 °C, 60 °C y 65 °C) y pH (3,5-7,5) usando celobiosa (3,3 g/l) como sustrato. Los procedimientos experimentales y analíticos se describen en el Ejemplo 3. Bgl1 C1 presentó actividad óptima a pH 5 y 50 °C, y la actividad de β -glucosidasa detectable (20 % de actividad óptima) se observó bajo condiciones de selección de alto rendimiento (pH 5 y 65 °C).

15 Ejemplo 5: Ensayos de alto rendimiento para identificar variantes de Bgl1 C1 mejoradas

20 Se transformaron bibliotecas de plásmidos que contenían genes *Bgl1 C1* de variante en la cepa INVSC1 de *S. cerevisiae* y se sembraron sobre placa de agar con SD-ura que contenía 2 % de glucosa. Después de la incubación durante al menos el 48 horas a 30 °C, las colonias se recogieron usando un recolector de colonias robotizado Q-bot® (Genetix USA, Inc., Beaverton, OR) en placas de microtitulación de pocillos de 96 pocillos poco profundas que contenían 200 μ l de medio SD-ura y 6 % de glucosa. Las células se cultivaron durante 24 horas a 30 °C con agitación a 250 rpm y 85 % de humedad. Entonces, 20 μ l de este cultivo durante la noche se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (pocillo profundo) que contenían 380 μ l de medio SD-ura y 2 % de glucosa como se ha descrito en el Ejemplo 2. Las placas se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm y 85 % de humedad durante 48 horas. Las placas profundas se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante de medio claro que contenía la enzima Bgl1 C1 secretada se usó para el ensayo de pNPG de alto rendimiento o de celobiosa.

30 Las bibliotecas de Bgl1 C1 se cribaron con alto rendimiento usando tanto ensayos de termoactividad como de termoestabilidad. En el ensayo de termoactividad, las variantes de Bgl1 C1 se cribaron con un ensayo de alta selección basado en celobiosa (sustrato: celobiosa; pH: 5,0; temperatura: 65 °C; tiempo: 21 h). Las variantes de Bgl1 C1 activas identificadas a partir del ensayo de termoactividad se sometieron posteriormente al ensayo de termoestabilidad. En el ensayo de termoestabilidad, las muestras de sobrenadante del medio HTP que contenían las enzimas de variante de Bgl1 C1 se preincubaron a pH 5, 65 °C durante 0 ó 6 horas. La actividad enzimática residual después de la exposición térmica se midió usando pNPG como sustrato a pH 5, 50 °C durante 1,5 h como se describe en el Ejemplo 3.

40 *Ensayo de termoactividad*

La selección por termoactividad fue un ensayo de alto rendimiento basado en celobiosa (HTA). En placas de microtitulación de 96 pocillos poco profundas, 75 μ l de sobrenadante de medio que contenía la enzima de variante de Bgl1 C1 se añadieron a 75 μ l de 6,6 g/l de celobiosa en tampón acetato sódico 300 mM a pH 5,0. Después de sellar con cinta de termosellado de laminado de aluminio/polipropileno (velocidad 11 (Menlo Park, CA), cat. n° 06643-001), las placas se agitaron a 65 °C durante 21 h. Las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm. En placas de microtitulación claras de pocillos poco profundos, 15 μ l de la mezcla de reacción se inactivaron con 185 μ l de disolución de reactivo GOPOD por pocillo. Las disoluciones se mezclaron suavemente durante 3 veces y la absorbancia se midió a 510 nm para la identificación de variantes de Bgl1 C1 de termoactividad mejorada.

50 *Ensayo de termoestabilidad*

La selección por termoestabilidad fue un ensayo de alto rendimiento basado en pNPG. En placas de microtitulación de 96 pocillos poco profundas, 180 μ l de sobrenadante de medio que contenía la enzima de variante de Bgl1 C1 activa se mezclaron con 30 μ l de tampón acetato sódico 1 M a pH 5,0. De un total de 210 μ l de la disolución de enzima, 120 μ l de la disolución de enzima se transfirieron a placas de PCR de 96 pocillos para el tratamiento de exposición térmica y los 90 μ l de disolución de enzima que quedaron en las placas de 96 pocillos poco profundas se usaron como muestra de enzima Bgl1 C1 sin exponer. Después de sellar con cinta de termosellado de laminado de aluminio/polipropileno (velocidad 11 (Menlo Park, CA), cat. n° 06643-001), las placas de PCR se calentaron en el ciclador térmico (MJ Research, Waltham, MA) a 65 °C durante 6 h. Después de la exposición térmica, 90 μ l de la disolución de enzima expuesta se transfirieron a placas de 96 pocillos poco profundos. Para iniciar la reacción de pNPG, en placas de 96 pocillos poco profundos, 90 μ l de disoluciones de enzima sin exponer o expuesta se mezclaron con 10 μ l de disolución de pNPG 15 mM (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO) en tampón acetato sódico 150 mM, pH 5. Las reacciones se incubaron a pH 5, 50 °C durante 1,5 h. Después de la reacción, 100 μ l de disolución de carbonato sódico 1 M a pH 11 se añadieron a la mezcla de reacción para extinguir la reacción. La absorbancia de la disolución se midió a 405 nm para determinar la conversión de pNPG a p-nitrofenilo. La actividad residual se calculó usando la fórmula:

% de actividad residual = 100 x (absorbancia de las muestras cuestionadas / absorbancia de las muestras no cuestionadas)

- 5 Las actividades residuales de variantes de Bgl1 C1 se compararon con las de la enzima nativa para identificar las variantes de termoestabilidad mejorada.

Ejemplo 6: Actividades y estabildades de β -glucosidasa mejoradas de variantes de Bgl1 C1 manipuladas

- 10 Las variantes de Bgl1 C1 mejoradas se identificaron de la selección de alto rendimiento de diversas bibliotecas de variantes de Bgl1 C1 como se describe en el Ejemplo 5. Una secuencia de variante de referencia que presenta actividad y estabilidad mejoradas en comparación con Bgl1 C1 natural se seleccionó como proteína de referencia (variante 3, como se muestra en las Tablas 2 y 3) y se generaron variantes de Bgl1 C1 adicionales y se evaluaron como se indica en la leyenda de la Tabla 3 para identificar variantes que tenían estabilidad y actividad mejoradas con respecto a la secuencia de referencia de la variante 3. Entonces, una de las variantes mejoradas de esta ronda se seleccionó como proteína de referencia (variante 269, como se muestra en la Tablas 3 y 4) y se generaron variantes de Bgl1 C1 adicionales y se evaluaron como se describe en la leyenda de la Tabla 4 para identificar variantes que tenían estabilidad y actividad mejoradas con respecto a la variante 269. Una variante (variante 481, como se muestra en las Tablas 4 y 5) se seleccionó de esta ronda como proteína de referencia y se generaron variantes de Bgl1 C1 adicionales y se evaluaron como se describe en la leyenda de la Tabla 5 para identificar variantes que tenían estabilidad y actividad mejoradas con respecto a la variante 481. Entonces se seleccionaron dos variantes (variante 647, como se muestra en las Tablas 5 y 6; y variante 664 como se muestra en la Tablas 5 y 7). Cada variante sirvió de proteína de referencia para separar rondas de selección. Se generaron variantes de Bgl1 C1 adicionales y se evaluaron como se describe en la leyenda de la Tabla 6 para identificar variantes que tenían estabilidad y actividad mejoradas con respecto a la variante 647. También se generaron variantes de Bgl1 C1 y se evaluaron como se describe en la leyenda de la Tabla 7 para identificar variantes que tenían estabilidad y actividad mejoradas con respecto a la variante 664.

- 30 Las Tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 resumen la mejora en termoactividades y termoestabilidades de ciertas variantes de Bgl1 C1 englobadas por la invención.

Ejemplo 7: Producción de variantes de β -glucosidasa mejoradas en el huésped C1

- 35 Se usó un procedimiento de fermentación de dos etapas (inoculación y fermentaciones principales a partir de esporas) para expresar genes de variantes *Bgl1 C1* en C1. Seis plásmidos que contenían genes de variantes *Bgl1 C1* se transformaron en la cepa C1 y se sembraron sobre placas de agar que contenían medio M3-01 con 22,93 % de sacarosa (componentes del medio M3-01: 6,0 g/l de nitrato sódico, 0,52 g/l de cloruro de potasio, 1,52 g/l de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), 0,24 g/l de sulfato de magnesio, 1,6 mg/l de sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO₄·5H₂O), 5 mg/l de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄·7H₂O), 22 mg/l de sulfato de cinc heptahidratado (ZnSO₄·7H₂O), 5 mg/l de cloruro de manganeso (II) tetrahidratado (MnCl₂·4H₂O), 1,8 mg/l de sulfato de cobalto (II) heptahidratado (CoSO₄·7H₂O), 1,5 mg/l de molibdato de sodio dihidratado (Na₂MoO₄·2H₂O), 11 mg/l de ácido bórico, 50 mg/l de EDTA, 10,0 g/l de glucosa, 1,0 g/l de aminoácidos CAS (Tritium Microbiologie B. V., Los Países Bajos), 16 g/l de agar, 1 ml/l de 1000x Pen/Estrep después de la esterilización (1000x Pen/Estrep: 2 g de penicilina G y 5 g de estreptomina disuelta en 100 ml de H₂O, esterilizada por filtración). El pH del medio se ajustó a 6,5 con KOH 10 M y se esterilizó en autoclave durante 25 minutos a 121 °C. Las placas se incubaron a 35 °C durante 5 días. Las esporas recogidas de las placas de agar se usaron para inocular un medio de inóculo F1-01 de 100 ml esterilizado en un matraz Erlenmeyer de 500 ml para alcanzar 5*10⁴-10⁵ esporas/ml de número de esporas inicial (componentes del medio de inóculo F1-01: 0,50 g/l de fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄), 0,05 g/l de cloruro de potasio, 0,007 g/l de sulfato ferroso heptahidratado (FeSO₄·7H₂O), 1,00 g/l de extracto de levadura (solo KAT), 10 g/l de Pharmamedia (Traders Protein, Lubbock, TX, EE.UU.), 10 g/l de D(+)lactosa monohidratada, 10 g/l de glucosa después de la esterilización, 1 ml/l de 1000x Pen/Estrep después de la esterilización (1000x Pen/Estrep: 2 g de penicilina G y 5 g de estreptomina disuelta en 100 ml de H₂O, esterilizada por filtración). El pH del medio se ajustó a 7,0 con NaOH 10 M y se esterilizó en autoclave durante 25 minutos a 121 °C (el pH del medio después de la esterilización fue 6,5). Para preparar cultivo de inóculo, el matraz se incubó a 35 °C, 85 % de humedad durante 3 días con agitación a 250 rpm y 25 mm de desplazamiento. 15 ml del medio de fermentación principal esterilizado en un matraz Erlenmeyer de 100 ml se inocularon con 750 μ l del cultivo de inóculo obtenido (componentes del medio de fermentación principal F1-01: 0,66 g/l de fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄), 0,24 g/l de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), 8,00 g/l de sulfato de amonio, 12,00 g/l de citrato de sodio tribásico deshidratado, 0,15 g/l de extracto de levadura (solo KAT), 0,09 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado, 0,80 g/l de cloruro de calcio dihidratado, 24,80 g/l de Pharmamedia (Traders Protein, Lubbock, TX, USA), 26,40 g/l de D(+)lactosa monohidratada, 64,80 g/l de celulosa (AlphaCel BH200A)). El medio se esterilizó en autoclave durante 25 minutos a 121 °C. La fermentación principal se llevó a cabo por incubación a 35 °C, 85 % de humedad durante 6 días con agitación a 300 rpm y 25 mm de desplazamiento. Después de acabar la fermentación principal, las células se sedimentaron por centrifugación (4500 rpm, 15 min, 4 °C). El sobrenadante de medio claro que contenía la enzima Bgl1 C1 secretada se recogió y se guardó a -20 °C hasta que se usó.

Ejemplo 8: Termoestabilidades mejoradas de variantes de β -glucosidasa producidas en el huésped C1

Ocho variantes de Bgl1 C1 (3, 8, 70, 109, 143, 194, 269 y 270) y enzima nativa, producidas en el huésped C1, se caracterizaron para determinar sus estabilidades a alta temperatura (65 °C). Las muestras que contenían diversas enzimas de variante de Bgl1 C1 se pre-incubaron a pH 5, 65 °C durante 0, 6 ó 24 h. La actividad enzimática residual después de la exposición térmica se midió usando pNPG como sustrato a pH 5, 50 °C durante 20 min. La mejor variante de las ocho presentó hasta 34 veces de mejora en la estabilidad con respecto a la enzima nativa (FIGURA 1A y FIGURA 1B). La comparación de los perfiles de estabilidad de la enzima nativa y las ocho variantes de Bgl1 C1, producidas a partir de levadura y a partir de C1, mostró buena correlación entre los dos huéspedes. (FIGURA 1 C).

Ejemplo 9: Termoestabilidades de variantes de Bal1 de C1

Las termoestabilidades de las variantes de Bgl1 C1 mejoradas 3, 26 y 481 se compararon con las de la enzima Bgl1 C1 nativa. La actividad enzimática residual después de 24 h de incubación a pH 4,5, 65 °C se midió usando pNPG como sustrato a pH 5, 50 °C durante 20 min. La FIGURA 2A muestra que la variante 481 tuvo el mayor aumento en la actividad tras la exposición térmica.

La termoestabilidad de la variante de Bgl1 C1 mejorada 664 se comparó con la de la variante 481. La actividad enzimática residual después de 4 h de incubación a pH 4, 65 °C se midió usando pNPG como sustrato a pH 5, 50 °C durante 20 min. La FIGURA 2B muestra que la variante 664 tuvo actividad enzimática mejorada después de la exposición térmica con respecto a la variante 481.

La termoestabilidad de las variantes de Bgl1 C1 mejoradas 3, 481, 664, 916, 885 y 871 se comparó con la enzima nativa (FIGURA 3). La actividad enzimática residual se midió después de 72 h de incubación a pH 4,5, 65 °C usando un ensayo de pNPG a pH 5, 50 °C durante 20 min. Los resultados mostraron que las variantes 664, 916, 885 y 871 retuvieron actividad sustancial.

La actividad específica de la variante 871 se comparó con la enzima nativa, es decir, natural usando un ensayo de celobiosa (pH 4,5 o pH 5, 55 °C-75 °C; 8 g/l de celobiosa, 18 h de reacción). La FIGURA 4 muestra que la variante 871 produjo más glucosa en el ensayo que la enzima nativa.

La FIGURA 5 muestra un alineamiento de las variantes 871, 916, 885, 664, 647, 481, 269 y 3 con la secuencia de aminoácidos de Bgl1 C1 nativa.

	atgaaggctg	ctgcgcttct	ctgcctcttc	ggcagtaacc	ttgcggttgc	aggcgccatt	60
	gaatcgagaa	aggttcacca	gaagcccctc	gogagatctg	aaacctttta	cccgtegcca	120
	tggatgaate	ccaacgcgca	cggtctgggg	gaggectatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
5	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggctgag	240
	cagtgcgctg	gccaagtggg	cgogatecct	cgctttggac	ttcgcagtet	gtgcatgcat	300
	gactcccctc	tgggcatccg	aggagccgac	tacaactcag	cgttcccctc	tggccagacc	360
	gttgctgcta	cctgggatccg	cggtctgatg	taccgtcgcg	gctacgcaat	gggcccaggag	420
10	gccaaaggca	agggcatcaa	tgctcttctc	ggaccagtcg	ccggccccct	tggccgcatg	480
	cccagggggg	gtcgtaaactg	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cggcateggc	540
	atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgtea	tgccttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgcccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
15	atcagcgaaa	ccctctcctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720
	ccgtttgcgg	atgccgtccg	ggccggcgtc	ggctctgtca	tgtgctcgta	ccagcaggtc	780
	aacaactcgt	acgcctgcca	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttcgtcat	gagcgactgg	caggcacagc	acactggcgc	agcaagcgcc	900
	gtggctggtc	togatatgtc	catgcccggc	gacaccagct	tcaacactgg	cgtcagtttc	960
20	tggggcgcca	atctcacctc	cgccgtcctc	aaeggcacag	tccctgceeta	ccgtctcgac	1020
	gacatggcca	tggcctatcat	ggccgcectc	ttcaaggtea	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgateaact	tctccttctg	gaccgacgac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	ttcccacggt	gacgtccggc	ccgaccacgg	caacctcctc	1200
25	cgggagattg	ccgccaaggg	tacgggtgctg	ctgaagaata	ccggctctct	acctctgaac	1260
	aagccaaagt	tcggtggccgt	catcgggcag	gatgctgggt	cgagccccaa	cgggcccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcggtctg	taacgaaggg	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	cgtacctcgt	ttcccccgac	gcccgcctcc	agggccccggc	catccaggac	1440
30	ggcacgaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	tacgcccagg	aaaagacaaa	ggctctggtc	1500
	tgcagggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccc	actcaggcga	gggtacatc	1560
	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgacctgaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctgggtcaaga	acgtctcgag	ctgggtgcagc	aacaccatcg	tctgcatcca	ctcggctggc	1680
35	ccgggtcctcc	tgaaccgattg	gtaacgacaa	cccaacatca	cgcccatctc	ctgggctggg	1740
	cttccggggcc	aggagtcggg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	gggtcaacccc	1800
	gcccggcgct	cgcccttcac	ttggggcaag	acccgcgaaa	gctatggcgc	ggacgtcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	tgggtgcgcc	caacaggact	tcaccgaggg	cgctctcctc	1920
40	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcggtea	tctacgagtt	cgccacggc	1980
	ctgagctaca	ccaccttcga	gtacagcaac	atccgcgtcg	tcaagtccaa	cgtcagcgag	2040
	taccggccca	cgacgggcac	cacggcccag	gcccgcagct	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcgaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttcccctaca	tctaccagta	catctaccgg	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	ccggagggcc	tgggcccgatc	cccactacgg	ccagaccggc	2220
45	gaggagttec	tcccgcocca	cgccaccgat	gacgaccccc	agccgctcct	ccggctcctg	2280
	ggcggaaaact	cccccggggg	caaccgcccag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggaggtac	cgcagctcta	cgctctcgtg	2400
	ggcgggtcccg	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatggg	gatogaaccc	2460
50	ggcgagacga	ggcagttcac	cggcgcctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
	acgggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	ccaagacggg	catatgttgg	gaggagcagc	2580
	cggaagttgg	atctcaagat	tgagcttctc	tga			2613

55 SEQ ID N °: 2: De tipo salvaje C1 Bgl1 polipéptido de secuencia; péptido señal se indica en negrita

60

65

	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYPSP	WMNPADGWA	EAYAQAQSFV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGIRGAD	YNSAFPSGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMQOE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEF	APDPVLTGIG	180
5	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHFRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELHLW	240
	PFADAVRAGV	GSVMCSYQQV	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	QAQHTGAASA	300
	VAGLDMSMPG	DTQFNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMAMRIMAAL	FKVTKTTDLE	360
	PINFSTWDD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNLI	REIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
10	KPKFVAVIGE	DAGSSPNPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPP	AALQARAIQD	480
	GTRYESVLSN	YAEKTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
	LVKNVSSWCS	NTIVVIHVS	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVN	600
	AARSPFTWPK	TRESYGADVL	YKPNNGNGAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVD	DSVIYEFHG	660
	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTAQ	APTGFNFSTD	LEDYLPKDE	FPYIYQYIYP	720
15	YLNTTDPARR	SADPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPFGNRQ	LYDIVYTITA	780
	DITNTGSSVVG	EEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLNSWDV	840
	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIPL				870

20 SEQ ID NO: 3: secuencia polinucleotídica de codificación de tipo salvaje de *Chrysosporium lucknowense* proteína β-glucosidasa1 utilizando codones sesgada para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. La proteína codificada por SEQ ID NO: 3 es la SEQ ID NO. 2

25 ATAGAAAAGTAGAAAAGGTA
I E S R K V

CATCAAAAACCATTAGCTAGATCAGAACCATTCTACCCCTTCTCCATGGATGAACCCCTAATGCAGATGGATGGGCAGAAGCATATGCTCAG
H Q K P L A R S E P F Y P S P W M N P N A D G W A E A Y A Q
GCCAAGAGTTTTGTCTCCAGATGACTCTGTTGGAAAAGGTTAATCTGACAAACAGGAGTAGGATGGGGTGCAGAACAGTGTGTCGCCCAA
A K S F V S Q M T L L E K V N L T T G V G W G A E Q C V G Q
30 GTTGGTGTCTATCCCTAGATTGGGTCTTAGAAGTTTGTGTATGCACGATTCTCCCTTAGGTATAAGAGGCGCTGACTATAACTCAGCATT
V G A I P R L G L R S L C M H D T A S P L G I R G A D Y N S A F
CCATCCGGGCAACTGTGTCTGCGACATGGGACAGGGTTTGTATAGATAAGGGGTTATGCGATGGGTCAAGAGGCAAGGGTAAGGA
P S G Q T V A A T W D R G L M Y R R G Y A M G Q E A K G K G
ATTAATGTATTGTGGGGCCGGTGGCGGGCCACTGGGAAGAAATGCCAGAAGTGGGAAGGAAGTGGGAAGGATTCGCCCGACCCAGT
I N V L L G P V A G P L G R M P E G G R N W E G F A P D P V
35 CTAACAGGTATAGGTATCCGAAACGATCAAAGGCATACAAGATGCAGGTATTATCGCCTGTGGAAGCATTATTATGGTAAATGAACAA
L T G I G M S E T I K G I Q D A G V I A C A K H P I G N E Q
GAGCATTTCGTCAAGTCCAGAGGCTCAAGTTATGGTTATAATATTTCTGAACTTTAAGTTCCAACATCGATGACAAAACCATGCAC
E H F R Q V P E A Q G Y G Y N I S E T L S S N I D D K T M H
GAGTTATACTTATGGCCTTTTGCAGACGCTGTGAGAGCTGGCGTTGGCTCTGTTATGTGCTCTTATCAGCAAGTTAATAACTCTTACGCC
E L Y L W P F A D A V R A G V G S V M C S Y Q Q V N N S Y A
40 TGTCAAAATCCAAGTTACTAAATGACTTATTGAAGAACGAAGTGGATTCCAAGGATTCGTATGAGCGATTGGCAAGCACAGCATACT
C Q N S K L L N D L L K N E L G F Q G F V M S D W Q A Q H T
GGTGTGCATCCGCTGTGGCAGGATTAGATATGTCAATGCCAGAGATACACAATTAATACTGGCGTTAGTTTTGGGGTGCAAAACCTA
G A A S A V A G L D M S M P G D T Q F N T G V S F W G A N L
ACTTTAGCTGTTCTAAACGGTACGGTACCTGCATATCGTTTAGACGACATGGCCATCGGTATAATGGCTGCTTTATTCAAAGTTACAAA
45 T L A V L N G T V P A Y R L D D M A M R I M A A L F K V T K
ACCACCGATTAGAACCAATTAATTTAGTTTTTGGACAGATGACACATATGGTCTTATACACTGGGCTGCTAAGCAAGGGTACCAAGAA
T T D L E P I N F S P W T D D T Y G P I H W A A K Q G Y Q E
ATAAATAGTCACGTTGACGTAAGAGCGGATCACGGCAATCTTATCAGAGAGATAGCAGCAAAGGGAACTGTATTGTGAAGAATACTGGT
I N S H V D V R A D H G N L I R E I A A K G T V L L K N T G
TCATTACCACTAAACAAACCAAGTTTGTGCGAGTCATTGGTGAAGATGCTGGTTCATCCCTAATGGACCAAAATGGTTGTAGTGACAGA
50 S L P L N K P K F V A V I G E D A G S S P N G P N G C S D R
GGCTGCAATGAAGGCACGTTGGCAATGGGCTGGGGCTCAGGGACTGCCAATTAACCCCTATTTGGTCTCTCCGGATGCGGCTTTACAGGCT
G C N E G T L A M G W G S G T A N Y P Y L V S P D A A L Q A
AGAGCAATCCAGGATGGTACTAGATACGAGAGCGTCCCTAAGTAACTATGCCGAAGAAAAGACTAAGGCCTTAGTCAGTCAAGCCATGCC
R A I Q D G T R Y E S V L S N Y A E E K T K A L V S Q A N A
ACTGCTATCGTTTTCGTAAACCGGATTCGGCGAAGTTATATCAATGTTGATGGTAATGAAGGTGACAGAAAGAATTTAACTTTATGG
55 T A I V F V N A D S G E G Y I N V D G N E G D R K N L T L W
AATAACGGCGACACATTAGTTAAAAATGTATCAAGTTGGTGTTCCTAATCTATCGTGTGATACATTCTGTTGGTCCAGTTTACTGACA

ES 2 455 269 T3

N N G D T L V K N V S S W C S N T I V V I H S V G P V L L T
 GACTGGTACGATAACCCAAACATFACCGCCATTTTATGGGCAGGTCTGCCAGGGCAGGAATCAGGAAATTCATTACGGACGTACTATAC
 D W Y D N P N I T A I L W A G L P G Q E S G N S I T D V L Y
 5 GGAAAGGTTAACCCAGCCGCCCAGGAGCCCTTTCACATGGGGTAAGACAAGAGAGAGCTACGGAGCTGATGTTCTTTATAAACCGAACAC
 G K V N P A A R S P P T W G K T R E S Y G A D V L Y K P N N
 GGAATGGAGCGCCACAGCAAGATTTTACTGAAGGTGTGTTTCATGACTATAGATACTTCGACAAAGTTGACGATGACTCAGTTATATAT
 G N G A P Q Q D F T E G V F I D Y R Y F D K V D D D S V I Y
 GAATTCGGTCACGGTCTATCTTATACTACTTTTGAATATTCAAATATAAGAGTAGTCAAAGTAATGTTTCTGAATATAGGCCGACCACC
 10 E F G H G L S Y T T F E Y S N I R V V K S N V S E Y R P T T
 GGAACGACGGCTCAAGCGCCTACCTTCGGTAATTTTCAACGGATTTAGAAGATTATTTATTTCCCAAAGACGAATTTCCATACATCTAC
 G T T A Q A P T F G N F S T D L E D Y L F P K D E F P Y I Y
 CAATACATATACCCTATCTGAATACTACCGATCCAAGAAGAGCTTCTGCCGATCCACATTACGGGCAGACTGCCGAAGAGTTCTTGCCA
 Q Y I Y P Y L N T T D P R R A S A D P H Y G Q T A E E F L P
 15 CCACACGCTACTGACGACGATCCTCAACCTCTTCTGAGGTCCAGTGGCGGAAATTCACCTGGTGGTAATAGGCAGCTGTATGATATTGTG
 P H A T D D D P Q P L L R S S G G N S P G G N R Q L Y D I V
 TATACTATAACGGCTGATATTACTAATACTGGTAGCGTTGTTGGTGAAGAAGTGCCGCAATTATATGTGTCTTTAGGTGGTCCGGAAGAT
 Y T I T A D I T N T G S V V G E E V P Q L Y V S L G G P E D
 CCTAAGGTTCAAGGACTTTGATAGGATGAGAATAGAACCTGGAGAAACTAGGCAATTTACAGGTAGATTGACCCGTAGGGATCTG
 20 P K V Q L R D P D R M R I E P G E T R Q F T G R L T R R D L
 TCAAACGGGATGTAACAGTGAAGATTGGGTAATCAGCAGGTACCCGAAACTGCATACGTGGGTAGATCTTCCCGTAAGTTAGATTG
 S N W D V T V Q D W V I S R Y P K T A Y V G R S S R K L D L
 AAAATTGAATTGCCATAA
 K I E L P *

25 SEQ ID NO:4 C1 Variante 3 cDNA secuencia

atgaaggctg	ctgcgctttc	ctgcctcttc	ggcagtacc	ttgccgttgc	aggcgccatt	60
gaatcgagaa	agggtcacca	gaagcccctc	gcgagatctg	aaccttttta	ccgctcgcca	120
tggatgaatc	ccaacgccga	cggctgggcg	gaggcctatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggccaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggctgag	240
cagtgcgtcg	gccaagtggg	cgcgatccct	cgccttggac	ttcgcagtct	gtgcatgcat	300
gactcccctc	tggcatccg	aggagccgac	tacaactcag	cgttcccctc	tggccagacc	360
gttgctgcta	cctgggatcg	cggctctgatg	taccgtcgcg	gctacgcaat	gggccaggag	420
gccaaaggca	agggatcaa	tgctcttctc	ggaccagtcg	ccggccccct	tggccgcatg	480
cccgagggcg	gtcgtaactg	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cggcatcggc	540
atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgctca	tcgcttgtgc	gaagcacttt	600
attggaaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
atcagcgaaa	ccctctcctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720

45

50

55

60

65

ES 2 455 269 T3

	cogtttgccg	atgccgtoeg	ggccggcgte	ggctctgtca	tgtgctcgta	ccagcaggte	780
	aacaactcgt	acgcctgcca	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttcgtcat	gagcgactgg	tgggcacagc	acactggcgc	agcaagcgcc	900
5	gtggctggtc	tcgatatgtc	catgccgggg	gacacccagt	tcaacactgg	cgtcagtttc	960
	tggggcgcca	atctcaccct	cgccgtcctc	aacggccacag	tccctgccta	ccgtctcgac	1020
	gacatggcca	tgcgcatcat	ggccgcccct	ttcaaggcca	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctccttctg	gaccctggac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	ttcccacggt	gacgtccgcg	ccgaccacgg	caacctcatc	1200
10	cggaacattg	ccgccaaggg	tacgggtgctg	ctgaagaata	ccggctctct	acctctgaac	1260
	aagccaaagt	tcgtggccgt	catcggcgag	gatgctgggt	cgagccccc	cgggcccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcggtg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaaactatc	cgtacctcgt	ttccccgcac	gccgcgctcc	aggcccgggc	catccaggac	1440
15	ggcacgagg	acgagagcgt	cctgtccaac	tacgcccagg	aaaagacaaa	ggctctggtc	1500
	tcgaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccg	actcaggcga	gggctacatc	1560
	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctggccaaga	acgtctcgag	ctgggtgcagc	aacaccatcg	tcgtcatcca	ctcggctcggc	1680
	ccggctcctcc	ggaccogattg	gtacgacaac	cccaacatca	cgccattctc	ctgggtcggg	1740
20	cttccgggccc	aggagtcggg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
	gcccggcgct	cgcccttcac	ttggggcaag	accgcgaaa	gctatggcgc	ggacgtcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	tggtgccc	caacaggact	tcaccgaggg	cgctctcatc	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcggcca	tctacgagtt	cgcccacggc	1980
25	ctgagctaca	ccaccttcga	gtacagcaac	atccgcgctc	tcaagtcaca	cgtcagcgag	2040
	taccggccca	cgacgggccc	cacggcccag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcagaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttccctaca	tctaccagta	catctaccgg	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	ccggagggcc	tcggccgac	cccactacgg	ccagaccgcc	2220
	gaggagtcc	tcccgcacca	cgccaccgat	gacgaccccc	agccgctcct	ccggctcctg	2280
30	ggcggaaact	cccccgggcg	caaccgccc	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggaggctac	cgcagctcta	cgctctcgtg	2400
	ggcggctccc	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgcg	gatcgaaccc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cgcccgctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgct	2520
	acgggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	cccaagacgg	catatgttgg	gaggagcagc	2580
35	cggaagtgg	atctcaagat	tgagcttctc	tga			2613

SEQ ID NO:5 C1 Variante 3 Polipéptido Secuencia

40	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYFSP	WMNPNADGWA	EAYAQAQKSPV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGIRGAD	YNSAFPSSGQT	120
45	VAATWDRGLM	YRRGYAMGQE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEF	APDPVLTGIG	180
	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHFRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHLYLW	240
	PFADAVRAGV	GSVMCSYQV	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
	VAGLDMSMPG	DTQFNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMAMRIMAAL	FKVTKTTDLE	360
	PINFSPWTL	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
50	KPKFVAVIGE	DAGSSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQARAIQD	480
	GTRYESVLSN	YAEKTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNGDT	540
	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVN	600
	AARSPFTWGK	TRESYGADVL	YKPNNNGAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVD	DSVIYEFHG	660
55	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTAQ	APTFGNFSTD	LEDYLFPKDE	FPYIYQYIYP	720
	YLNTTDP	SADPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLRSS	GGNSPGGNRQ	LYDIVYTITA	780
	DITNTGSVVG	EEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLNWDV	840
	TVQDWISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIPL				870

60 SEQ ID NO:6 C1 Variante 269 cDNA Secuencia

65

ES 2 455 269 T3

	atgaaggetg	ctgcgctttc	ctgcctcttc	ggcagtaacc	ttgccggttg	aggcgccatt	60
	gaatcgagaa	aggttcacca	gaagccccctc	gcgagatctg	aaccttttta	cccgtcgcca	120
	tggatgaatc	ccaacgccga	oggctggggcg	gaggcctatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
5	tcccaaataga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggctgag	240
	cagtgcgtcg	gccaagtggg	cgcgatccct	cgccttggac	ttcgcagctc	gtgcatgcat	300
	gactccccctc	tgcgcatccg	aggagccgac	tacaactcag	cgttccccctc	tggccagacc	360
	gttgctgcta	cctgggatcg	cggtctgatg	taccgtcgcg	gtaacgcaat	gggccaggag	420
10	gccaaaggca	agggcatcaa	tgtcctttctc	ggaccagtcg	ccggccccct	tggccgcatg	480
	cccagggcg	gtcgtaacgt	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cggcatcggc	540
	atgtccgaga	gcatacaagg	cattcaggat	gctggcgta	tcgcttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
	atcagcgaaa	ccctctctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720
15	ccgtttgccg	atgccgtccg	ggccggggctc	ggctctgtca	tgtgctcgta	caaccaggtc	780
	aacaactcgt	acgcctgcc	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggttttcagg	gcttcgtcat	gagcgcactgg	tgggcacagc	acactggcgc	agcaagcgcc	900
	gtggctggtc	tcgatatgtc	catgccgggc	gacaccatgt	tcaacactgg	cgtcagtttc	960
	tggggcgcca	atctcaccc	cgcctctctc	aacggcacag	tccttgccta	ccgtctcgac	1020
20	gacatggcca	tgcgcatcat	ggccgcccc	ttcaaggcca	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctccttctg	gaccgcgcac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	ttcccacggt	gacgtccgcg	ccgaccacgg	caacctcatc	1200
	cggaacattg	ccgccaaggg	tacgggtgctg	ctgaagaata	ccggctctct	accctgaac	1260
25							
	aagccaaagt	tcgtagccgt	catcggcgag	gatgctgggc	cgagcccca	cgggcccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcggctg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	ogtacctcgt	ttcccccgac	gcgcgctcc	agttgcgggc	catccaggac	1440
	ggcacagggt	acgagagcgt	cctgtccaac	tacgcgaggg	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
30	tgcagggcca	tgcacaaccg	catcgtcttc	gtcaatgccc	actcaggcga	gggtacatc	1560
	aacgtggaag	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctggtcaaga	acgtctcgag	ctggtgcagc	aacaccatcg	togtcatcca	ctcggctcggc	1680
	ccggtcctcc	tgaccgattg	gtacgacaac	ccccacatca	cggccattct	ctgggctggt	1740
35	cttccggggc	aggagtcggg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
	gcccgcgcgt	cgcccttcac	ttggggcaag	accgcgaaa	gctatggcgc	ggacgtcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttggggcgcc	caacaggact	tcaccgaggg	cgtcttcatc	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcggcca	tctacgagtt	cgccacggc	1980
	ctgagctaca	ccaccttoga	gtacagcaac	atccgcgtcg	tcaagtcca	cgtcagcgag	2040
40	taccggccca	cgacgggcac	caaggcccag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcgaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttcccctaca	tctaccagta	catctacccg	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	ccggagggcc	tggccgac	cccactacgg	ccagaccgcc	2220
	gaggagttcc	tcccgcacca	cgccaccgat	gacgaccccc	agccgctcct	ccggtcctcg	2280
	ggcggaact	cccccgccg	caaccgccag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
45	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggaggtac	cgcagctcta	cgtctcgtg	2400
	ggcggtcccg	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgcg	gatcgaaccc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cgccgcctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
	acggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	ccccagacgg	catatgttgg	gaggagcagc	2580
50	cggaagttag	atctcaagat	tgagcttctc	tga			2613

SEQ ID NO:7 C1 Variante 269 Polypéptido Secuencia

55

60

65

ES 2 455 269 T3

	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYPSP	WMNPNADGWA	EAYAQAQSFV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGIRGAD	YNSAFPPSGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMQOE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEGF	APDFVLTGIG	180
5	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELYLW	240
	PFADAVRAGV	GSMVCSYNQV	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
	VAGLDMSMPG	DTMFNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMAMRIMAAL	FKVTKTTDLE	360
	PINFVFWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGSLI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
10	KPKFVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQLRAIQD	480
	GTRYESVLSN	YAEENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVN	600
	AARSPFTWVK	TRESYGADVL	YKPNNGNWAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVD	DSVIYEFHG	660
15	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTAQ	APTFGNFSTD	LEDYLFPKDE	FPYIYQYIYP	720
	YLNTTDPARR	SADPHYGQTA	EEFLPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPFGNRQ	LYDIVYTITA	780
	DITNTGSVVG	EEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLNSWDV	840
20	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIPL				870

SEQ ID NO:8 C1 Variante 481 cDNA Secuencia

25	atgaaggctg	ctgegccttc	ctgcctcttc	ggcagtaacc	ttgcogttgc	aggcgccatt	60
	gaatcgagaa	agggtcacca	gaagcccctc	gcgagatctg	aaccttttta	cccgctgcca	120
	tggatgaate	ccaacgcgca	cggctggggc	gaggcctatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggctgag	240
	cagtgcgctg	gccaaagtgg	cgcgatccct	cgccttggac	ttcgagctct	gtgcattgat	300
30	gactcccctc	tcggcatccg	aggagccgac	tacaactcag	cgctcccctc	tggccagacc	360
	gttgctgcta	cctgggatcg	cggctctgat	taccgtcgcg	gctacgcaat	gggccaggag	420
	gccaaaggca	agggcaccaa	tgctcctctc	ggaccagctg	ccggccccct	tggccgcatg	480
	cccgagggcg	gtcgttaact	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cggcatcggc	540
35	atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgctc	tcgcttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
	atcagcgaaa	ccctctcctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720
	ccgtttgccg	atgccgctcg	ggccggcgct	ggctctgtca	tgtgctcgta	caaccaggtc	780
	aacaactcgt	acgcctgcca	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
40	gggtttcagg	gcttcgctcat	gagcgactgg	tgggcacagc	acactggcgc	agcaagcgcc	900
	gtggctggtc	tcgatatgtc	catgcggggc	gacaccatgt	tcaaacactgg	cgtcagtttc	960
	tggggcgcca	atctcacctc	cgcgctcctc	aacggcacag	tccttgctca	ccgtctcgac	1020
	gacatggcca	tgcgcatcat	ggccgccttc	ttcaaggtca	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
45	ccgatcaact	tctccttctg	gacccggcag	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	tccccacggt	gacgtccgcg	ccgaccaagg	caacctcacc	1200
	cggaaacatt	ccgccaaggg	taagggtgct	ctgaagaata	ccggctctct	acccttgaac	1260
	aagccaaagt	tcgtggccgt	catcggcgag	gatgctgggc	cgagcccaaa	cgggccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcgctg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
50	gccaactatc	cgtacctcgt	ttcccccgac	gcgcgctcc	agttgcgggc	catccaggac	1440
	ggcacgaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	taagccgagg	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
	tcgcaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccg	actcaggcga	gggctacatc	1560
	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cgggtgatac	1620
	ctggtcaaga	acgtctcgag	ctggtgcagc	aacaccatcg	tcgtcatcca	ctcggctggc	1680
55	ccggtcctcc	tgaccgattg	gtacgacaac	cccaacatca	cggccattct	ctgggctggg	1740
	cttcocgggcc	aggagtcggg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800

60

65

ES 2 455 269 T3

	gcgcgccgct	cgcccttcac	ttggggcaag	acccgcgaaa	gctatggcgc	ggacgtcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttgggcgccc	caacaggact	tcaccgaggg	cgtcttcac	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcgggca	tctacgagtt	cggccacggc	1980
5	ctgagctaca	ccaccttcga	gtacagcaac	atccgcgtcg	tcaagtccaa	cgtcagcggg	2040
	taccggccca	cgacggggcac	cacgattcag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcgaggact	atctcttccc	caaggacggg	ttccccctaca	tccccgagta	catctaccgg	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	ccggaggggcc	tgggcggatc	cccactacgg	ccagaccggc	2220
10	gaggagtcc	tccccgcccc	cgccaccgat	gacgaccccc	agccgctcct	ccggctctcg	2280
	ggcggaaact	cccccgggcg	caaccgcccag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggagggtac	cgcagctcta	cgtctcggctg	2400
	ggcggccccg	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgcg	gatcgaaccc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cggccgcctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
15	acggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	ccccagacgg	catatgttgg	gaggagcagc	2580
	cggaaagtgg	atctcaagat	tgagcttctt	tga			2613

SEQ ID NO:9 C1 Variante 481 Polipéptido Secuencia

20	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYSP	WMNPNADGWA	EAYAQAQSFV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGIRGAD	YNSAFPPSGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMQE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEGF	APDPVLTGIG	180
25	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELYLW	240
	PFADAVRAGV	GSMVCSYNQV	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
	VAGLDMSPMG	DTMFNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMAMRIMAAL	FKVTKTTDLE	360
	PINFSFWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
30	KPKFVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQLRAIQD	480
	GTRYESVLSN	YAEENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVNP	600
	AARSPFTWGK	TRESYGADVL	YKPNNGNWAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVDD	DSVIYEFHG	660
	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTIQ	APTFGNFSTD	LEDYLFPKDE	FPYIPQYIYP	720
35	YLNTTDPARR	SADPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPGGNRQ	LYDIVYTTITA	780
	DITNTGSSVVG	BEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLNSWDV	840
	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIIEP				870

40 SEQ ID NO:10 C1 Variante 482 cDNA Secuencia

45

50

55

60

65

ES 2 455 269 T3

	atgaaggetg	ctgcgctttc	ctgcctcttc	ggcagtacc	ttgcggttgc	aggcgccatt	60
	gaatcgagaa	aggttcacca	gaagcccc	gcgagatctg	aacdttttta	cccgtcgcca	120
5	tggatgaatc	ccaacgcoga	cggtcggg	gaggecatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggctgag	240
	cagtgcgtcg	gccaaagtggg	cgcgatccct	cgccctggac	ttcgagctct	gtgcatgcat	300
	gactcccc	tggcatccg	aggagccgac	tacaactcag	cgttcccc	tggccagacc	360
10	gttgctgcta	cctgggatcg	cggtctgatg	taccgtcgcg	gctacgcaat	gggcccaggag	420
	gccaaaggca	agggcatcaa	tgctctctc	ggaccagtgc	ccggcccc	tggcgcgatg	480
	cccagggg	gtcgtaaactg	ggaaggcttc	gctccgatc	ccgtccctac	gggcatcggc	540
	atgtccgaga	cgatcaagg	cattcaggat	gctggcgctc	tcgcttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
15	atcagcga	ccctctctc	caacattgac	gacaagacca	tgcaagagct	ctacctttgg	720
	ccgtttgcg	atgcctgcg	ggccggcg	ggctctgctc	tgtgctcgta	caaccaggtc	780
	aacaactcgt	acgcctgcca	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttcgtcat	gagcgactgg	tgggcacagc	acactggcgc	agcaagcgcc	900
	gtggtggtc	tcgatatgtc	catgcccggg	gacaccatgt	tcaacactgg	cgtcagtttc	960
20	tggggcgcca	atctcaacct	cgccgtctc	aacggcacag	tccttgccta	ccgtctgac	1020
	gacatggcca	tgcgcatcat	ggccgcccc	ttcaaggcca	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctcctctg	gacccgcgac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	ttcccacgtt	gacgtccg	ccgaccacgg	caacctcatc	1200
25	cggaacattg	ccgccaagg	taoggtgctg	ctgaagaata	ccggtctct	acctctgaac	1260
	aagccaaagt	tcgtggccgt	catcggcgaa	gatgctggc	cgagcccaa	ggggcccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcggctg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	cgtacctcgt	ttccccgac	gcgcgctcc	agttgcgggc	catccaggac	1440
	ggcacgaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	taogccgagg	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
30	tcgcaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccc	actcaggcga	gggctacatc	1560
	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctggtcaaga	acgtctcgag	ctggtgcagc	aacaccatcg	tcgtcatcca	ctcggctggc	1680
	ccggtctctc	tgaccgattg	gtacgacaac	cccaacatca	cggccattct	ctgggctggt	1740
	cttcggggcc	aggatcggg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
35	gcgcgcctc	cgcccttcac	ttggggcaag	accgcgaaa	gctatggcgc	ggacgtctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttgggcgccc	caacaggact	tcaccgaggg	cgtcttcatc	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcggcca	tctacgagtt	cgccacggc	1980
	ctgagctaca	ccaccttcga	gtacagcaac	atccgcgtcg	tcaagtcaca	cgtcagcgag	2040
40	taccggcca	cgacgggcac	cacggcccag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcagaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttccctaca	tccgcagta	catctacca	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	ccggagggcc	tcggccgatc	cccactacgg	ccagaccgcc	2220
45	gaggagtcc	tcccgcacca	cgccacogat	gacgacccc	agccgctcct	ccggtcctcg	2280
	ggcggaaact	cccccggg	caaccgcccag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggaggtac	cgcagctcta	cgtctcgtg	2400
	ggcggctccg	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgog	gatcgaacct	2460
	ggcgagaaaa	ggcagttcac	cgccgcctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
50	acgggtgcag	actgggtcat	cagcaggtat	cccaagacgg	catatggttg	gaggagcagc	2580
	cggaagtgg	atctcaagat	tgagcttctc	tga			2613

SEQ ID NO:11 C1 Variante 482 polipéptido secuencia

55

60

65

ES 2 455 269 T3

	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYPSP	WMNPNADGWA	EAYAQAQSFV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGIRGAD	YNSAFPSSQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMQOE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEGF	APDPVLTGIG	180
5	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHFRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELYLW	240
	PFADAVRAGV	GSMVCSYNQV	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
	VAGLDMSMPG	DTMFNTGVSP	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMAMRIMAAL	FKVTKTDDLE	360
	PINPSFWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
10	KPKPVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQLRAIQD	480
	GTRYESVLSN	YAEENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVPN	600
	AARSPFTWVK	TRESYGADVL	YKPNNGNWAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVDD	DSVIYEFHG	660
15	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTAQ	APTFGNFSTD	LEDYLFPKDE	FPYIPQYIYP	720
	YLNTTDPARR	SADPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPPGGRQ	LYDIVYTITA	780
	DITNTGSVVG	EEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GEKROFTGRL	TRRDLNWDV	840
	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIPL				870

20 SEQ ID NO:12 C1 Variante 664 cDNA Secuencia

25	atgaaggctg	ctgcgcttcc	ctgcctcttc	ggcagtaccc	ttgccggttg	aggcgccatt	60
	gaatcgagaa	aggttcacca	gaagcccctc	gcgagatctg	aaccttttta	cccgtcgcca	120
	tggatgaatc	ccaacgccga	cggctgggcg	gaggcctatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggctgag	240
30	cagtgcgctg	gccaaagtgg	cgcgatccct	cgccttggac	ttcgcagtct	gtgcatgcat	300
	gactcccctc	tggcgtgctg	aggagccgac	tacaactcag	cgttcccctc	tggccagacc	360
	gttgcctgta	cctgggatcg	cggtctgatg	taccgctcgg	gctacgcaat	gggccaggag	420
	gccaaaggca	agggcatcaa	tgtccttctc	ggaccagtcg	ccggccccct	tggccgcatg	480

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 455 269 T3

	cccgagggcg	gtcgtaaactg	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cggcacoggc	540
	atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgta	tcgcttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
5	atcagcgaaa	ccctctctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720
	ccgtttgccg	atgccgtccg	ggccggcgtc	ggctctgtca	tgtgctcgta	caaccagggc	780
	aacaactcgt	acgcctgcc	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttcgcat	gagcgactgg	tgggcacagc	acactggcgc	agcaagcggc	900
10	gtggctggtc	tcgatatgtc	catgccgggc	gacaccatgc	tgaacactgg	cgtcagtttc	960
	tggggcgcca	atctcacctc	cgccgtcctc	aacggcacag	tccttgccca	ccgtctcgac	1020
	gacatggcca	tcgcatcat	ggccgcctc	ttcaaggtca	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctcctctg	gacccgcgac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	ttcccacggt	gacgtccgcg	ccgaccacgg	caacctcctc	1200
15	cggaacattg	ccgccaaggg	tacggtgctg	ctgaagaata	ccggctctct	accctgcaac	1260
	aagccaaagt	tcgtggcctg	catcggcgag	gatgctgggc	cgagcccaaa	cgggcccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcggctg	taacgaaggg	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	cgtacctcgt	ttcccccgac	gccgcgctcc	aggcgcgggc	catccaggac	1440
20	ggcacgaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	taocgcgagg	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
	tcgcaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccg	actcaggcga	gggtacatc	1560
	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctggtcaaga	acgtctcgag	ctggtgcagc	aacaccatcg	tcgtcatcca	ctcggctggc	1680
	ccggtcctcc	tgaccgatg	gtacgacaac	ccccacatca	cgccattct	ctgggctggg	1740
25	cttcocggcc	aggagtccgg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
	gccgcccctg	cgcccttcac	ttggggcaag	accgcgcaaa	gctatggcgc	ggacgtcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttggggcgccc	caacaggact	tcaccgaggg	cgtcttcctc	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcgggtc	tctacgagtt	cgccacggc	1980
30	ctgagctaca	ccaccttcga	gtacagcaac	atccgcgctg	tcaagtccaa	cgtcagcgag	2040
	taccggccca	cgacgggcac	cacgatctag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcagaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttcccttaca	tcccgcagta	catctaccgg	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	ccggaggggc	tggggcgatc	cccactacgg	ccagaccgcc	2220
	gaggagttcc	tcccgcacca	cgccaccgac	gacgaccccc	agccgctcct	ccggtcctcg	2280
35	ggcggaaact	cccccgggcg	caaccgccaag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggaggtac	cgcagctcta	cgtctcggctg	2400
	ggcggctccg	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatggg	gatcgaaccc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cgccgcctcg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
40	acgggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	cccaagacgg	catatggttg	gaggagcagc	2580
	cggaagttgg	atctcaagat	tgagcttctc	tga			2613

SEQ ID NO:13 C1 Variante 664 polipéptido secuencia

45	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYSP	WMNPNADGWA	EAYAQAQSFV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGVRGAD	YNSAFPSGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMQOE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEFG	APDPVLTGIG	180
	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHFRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELYLW	240
50	PFADAVRAGV	G SVMCSYNQG	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
	VAGLDMSMPG	DTMLNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMAMRIMAAL	FKVTKTTDLE	360
	PINFSPWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHG NLI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
	KPKFVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQARAIQD	480
55	GTRYESVLSN	YAEENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVN	600
	AARSPFTWVK	TRESYGADVL	YKPNNGNWAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVD	DSVIYEFHG	660
	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTIQ	APTFGNFSTD	LEDYLFPKDE	FPYIPQYIYP	720
	YLNTTDP RRA	SGDPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPGGNRQ	LYDIVYTITA	780
60	DITNTGSVVG	EEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLNWDV	840
	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIELP				870

SEQ ID NO:14 C1 Variante 647 cDNA Secuencia

65

ES 2 455 269 T3

	atgaaggctg	ctgcgcttcc	ctgcctcttc	ggcagtagcc	ttgcccgttg	aggcgcatt	60
	gaatcgagaa	aggttcacca	gaagccctc	gogagatctg	aacctttta	ccgctcgcca	120
	tggatgaatc	ccaaocccat	tggctgggcg	gaggcctatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
5	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggctgag	240
	cagtgcgtcg	gccaagtggg	cgcatccct	cgcttggac	ttcgcagtet	gtgatgat	300
	gactccctc	tggcatccg	aggagccgac	tacaactcag	cgttccctc	tggccagacc	360
	gttgctgcta	cctgggatcg	cggtctgatg	taccgtcgcg	gctacgcaat	gggcccaggag	420
10	gccccaggca	agggatcaa	tgtccttctc	ggaccagtcg	ccggccctc	tggccgcatg	480
	cccgaggcg	gtcgtaactg	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cgcatcggc	540
	atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgta	tgccttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
	atcagcgaaa	ccctctctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720
15	ccgtttgccc	atgcccgtcg	ggcccggctc	ggctctgta	tgtgctcgta	caaccaggtc	780
	aacaactcgt	acgcctgcca	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttcgctcat	gagcagactg	tgggcacagc	acactggcgc	agcaagcgc	900
	gtggctggtc	togatatgtc	catgcccggc	gacacatgt	tcaacactgg	cgtcagtttc	960
20							
	tggggcgcca	atctcacctc	cgccgtctc	aacggcacag	tccctgcta	ccgtctcgac	1020
	gacatgtgca	tgcgcatcat	ggccgcccctc	ttcaaggta	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctccttctg	gaccgogac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
25	cagggtacc	aggagattaa	ttcccacggt	gacgtccgcg	ccgaccacgg	caacctcatc	1200
	cggaacattg	ccgccaaggg	tacgggtctg	ctgaagaata	ccggctctct	acctctgaac	1260
	aagccaaagt	tctggtccgt	catcggcgag	gatgctgggc	cgagcccaa	cgggcccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcccgtg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	cgtaacctcg	ttcccccgac	gcccgcctcc	agttgcccgc	catccaggac	1440
30	ggcacgaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	tacgcccagg	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
	tgcgaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccc	actcaggcga	gggctacatc	1560
	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctggtcaaga	acgtctcgag	ctggtgcagc	aacacatcgt	tctgcatcca	ctcggtcggc	1680
35	ccggctcctc	tgaccgatg	gtacgacaac	cccaacatca	cgccattct	ctgggctggg	1740
	cttccggggc	aggagtccgg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
	gcccggcct	cgcccttcac	ttggggcaag	acccgcgaaa	gctatggcgc	ggaactcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttgggcccgc	caacaggact	tcaaccgagg	cgctctcctc	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcggta	tctacgagtt	cgcccacggc	1980
40	ctgagctaca	ccaccttoga	gtacagcaac	atccgctcgt	tcaagtccaa	cgtcagcgag	2040
	taccggccca	cgacgggcaa	aacgattcag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcagggact	atctcttccc	caaggacgag	ttcccctaca	tcccgcagta	catctaccgg	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	ccggaggggc	tggccgacac	cccactacgg	ccagaccgcc	2220
45	gaggagtcc	tcccggccca	cgccaccgat	gacgaccccc	agccgctcct	ccggctcctg	2280
	ggcggaaaact	ccccggcggg	caaccgcccag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcaoga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggaggtac	cgagctcta	cgctcctcgtg	2400
	ggcgggtccc	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgcg	gatcgaacc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cgcccgccctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
50	acgggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	cccaagacgg	catatggtgg	gaggagcagc	2580
	cggaagtgg	atctcaagat	tgagcttct	tga			2613

SEQ ID NO:15 C1 Variant e647 polipéptido secuencia

55	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYFSP	WMNPNAIGWA	EAYAQAQSFV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGIRGAD	YNSAFPSGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMQOE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEGF	APDPVLTGIG	180
	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHFRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHLYLW	240
60	PFADAVRAGV	GSMVCSYNQV	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
	VAGLDMSMPG	DTMFNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMCMRIMAAL	FKVTKTTDL	360
	PINFSFWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNLI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420

65

ES 2 455 269 T3

	KPKFVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQLRAIQD	480
	GTRYESVLSN	YABENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
5	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVNP	600
	AARSPFTWGK	TRESYGADVL	YKPNNGNWAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVDD	DSVIYBFGHG	660
	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGKTIQ	APTFGNFSTD	LEDYLFPKDE	FPYIPQYIYP	720
	YLNTTDPARR	SADPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPGGNRQ	LYDIVYTITA	780
10	DITNTGSVVG	BEVPLQYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIBP	GETRQFTGRL	TRRDLNWDV	840
	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIELP				870

SEQ ID NO:16 C1 Variante 871 cDNA Secuencia

15	atgaaggetg	ctgegetttc	ctgcctette	ggcagtagcc	ttgcctgtgc	aggcgcatt	60
	gaatcgagaa	aggttcacca	gaagccctc	gcgagatctg	aaccttttta	cccgtcgcca	120
	tggatgaatc	ccaacgccat	cggctgggcg	gaggcctatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	gggggaggag	240
20	cagtgcgctg	gcaacgtggg	cgcgatccct	cgccttggac	ttcgcagctc	gtgcatgcat	300
	gactccctc	tcggcgtgog	aggaaaccgac	tacaactcag	cgttccctc	tggccagacc	360
	gttgctgcta	cctgggatcg	cggctctgatg	taccgtcogc	gctacgcaat	gggcccaggag	420
	gccaaaggca	agggcatcaa	tgctctctc	ggaccagtcg	cggcccccct	tggccgcctg	480
	cccgagggcg	gtcgtaactg	ggaaggcttc	gctccggatc	cgtccttac	cggcatcggc	540
25	atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgtca	tgccttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
	atcagcgaaa	ccctctctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720
	ccgtttgccg	atgcgcgtcg	ggccggcgct	ggctctgtca	tgtgctcgta	caaccagggc	780
30	aacaactcgt	acgcctgcca	gaactcgaag	ctgctgaaag	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttcgctcat	gagcgactgg	tgggcacagc	acactggcgc	agcaagcggc	900
	gtggctggtc	togatatgtc	catgcggggc	gacaccatgg	tcaactctgg	cgtcagtttc	960
	tggggcgcca	atctcacctc	cgcgcctctc	aacggcacag	tccttgctca	ccgtctcgac	1020
35	gacatgtgca	tgcgcctcat	ggcgcctctc	ttcaaggtea	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctcctctctg	gacccgcgac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	ttcccacgct	gacgtccgcg	ccgaccacgg	caacctcctc	1200
	cggaacattg	ccgccaaggg	tacgggtgctg	ctgaagaata	ccggctctct	acctctgaac	1260
	aagccaaagt	togtggccgt	catcggcgag	gatgctgggc	cgagcccca	cgggcccac	1320
40	ggctgcagcg	accgcggctg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggtgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	cgtaacctcg	ttccccgac	gcccgcctcc	agggcggggc	catccaggac	1440
	ggcacgaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	tacggcgagg	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
45	tgcaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgcog	actcaggcga	gggtacatc	1560
	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctggtcaaga	acgtctcgag	ctggtgcagc	aacaccatcg	tctgcatcca	ctcggctggc	1680
	ccggtcctcc	tgaccgattg	gtacgacaac	cccaacatca	cgccattctc	ctgggtgggt	1740
50	cttccggggc	aggagtgggg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
	gcgcgccgct	cgcccttcac	ttggggcaag	accgcgaaa	gctatggcgc	ggacgtcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttggggcggc	caacaggact	tcaccgaggg	cgtcttcctc	1920
	gactaacgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcggtea	tctacgagtt	cggccaaggc	1980
	ctgagctaca	ccaccttoga	gtacagcaac	atccgcgtcg	tcaagtccaa	cgtcagcgag	2040
55	taccggccca	cgacgggcac	caagattcag	gcccgcagct	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcgaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttcccctaca	tcccgcagta	catctaccgg	2160
	tacctcaaca	cgaccgaccc	cgggagggcc	tggggcgatc	cccactacgg	ccagaccggc	2220
	gaggagtcc	tcccggccca	cgcaccgat	gacgaccccc	agccgctcct	cgggtcctcg	2280
60	ggcggaaact	ccccggcggg	caaccggcag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcacga	atacgggctc	cgttgttaggc	gaggaggtac	cgcagctcta	cgtctcgctg	2400
	ggcggctccg	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgcg	gatcgaaccc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cggccgcctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgct	2520
65	acgggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	cccaagacgg	catatgttgg	gaggagcagc	2580
	cggaaagtgg	atctcaagat	tgagcttccc	tga			2613

ES 2 455 269 T3

SEQ ID NO:17 C1 Variante 871 polipéptido secuencia

5	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQBKPL	ARSEPFYFSP	WMNPNAIGWA	EAYAQAQKSPV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGEE	QCVGNVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGVVRGTD	YNSAFPSGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMGQE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEFG	APDPVLTGIG	180
	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQBHFQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELYLW	240
	PFADAVRAGV	GSMVCSYNQG	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEI	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
10	VAGLDMSMPG	DTMVNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMCMRIMAAL	FKVTKTDDLE	360
	PINFSEWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
	KPKFVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQARAIQD	480
	GTRYESVLSN	YAEENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
15	LVKNVSSWCS	NTIVVIHVSQ	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVNQ	600
	AARSPFTWQK	TRESYGADVL	YKPNNGNWAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVVDD	DSVIYEFQHG	660
	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTGTITIQ	APTFGNFSTD	LEDYLFQKDE	FPYIPQYIYP	720
	YLNTTDPQRA	SGDPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPQGNRQ	LYDIVYTITA	780
20	DITNTGQSVG	EEVQQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLQNDWV	840
	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIQLP				870

SEQ ID NO:18 C1 Variante 885 cDNA secuencia

25	atgaaggctg	ctgcgcttcc	ctgcctcttc	ggcagtaacc	ttgcgcttgc	aggcgccatt	60
	gaatcgagaa	agggtcacca	gaagcccctc	gcgagatctg	aaacctttta	cccgctcgcca	120
	tggatgaatc	ccaacgccat	cggctgggcg	gaggcctatg	cccaggccaa	gtcctttgtc	180
	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccaagg	gagtcggctg	gggggctgag	240
30	cagtgcgctg	gcaacgtggg	cgcgatccct	cgctctggac	ttcgcagctc	gtgcatgcat	300
	gactcccctc	tgggctgctg	aggaagcgac	tacaactcag	cgctcccctc	tggccagacc	360
	gttgctgcta	cctgggatcg	cggtctgatg	taccgtcgcg	gctacgcaat	gggcccaggag	420
	gccaaaggca	agggcatcaa	tgtccttctc	ggaccagtcg	ccggccccct	tggccgcatg	480
35	cccgagggcg	gtcgttaactg	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cggcatcggc	540
	atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgctc	tcgcttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
	atcagcgaaa	ccctctcctc	caacattgac	gacaagacca	tgcacgagct	ctacctttgg	720
	ccgtttgccg	atgcgctccg	ggcccggcgtc	ggctctgtca	tgtgctcgta	caaccagggc	780
40	aacaactcgt	acgcctgcca	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttcgctcat	gagcgactgg	tgggcacagc	acctggcgcg	agcaagcgcc	900
	gtggctggtc	togatatgtc	catgccgggc	gacaccatgg	tcaacactgg	cgctcagttc	960
	tggggcgcca	atctcacctc	cgccgtcctc	aacggcacag	tccctgctca	ccgtctcgac	1020
45	gacatgtgca	tgcgcatcat	ggccgccttc	ttcaaggcca	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctcctctctg	gacccgcgac	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	aggagattaa	ttcccacgct	gacgtcccg	ccgaccacgg	caacctcctc	1200
	cggaaacattg	ccgccaaggg	tacgggtgctg	ctgaagaata	ccggtctctc	acctctgaac	1260
50	aagccaaagt	tcgctggcgtg	catcggcgag	gatgctgggc	cgagcccaaa	cgggcccaca	1320
	ggctgcagcg	accgcgctctg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	cgtacctcgt	ttcccccgac	gocgctcctc	aggcgcgggc	catccaggac	1440
	ggcacgaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	tacgcccag	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
	tgcgaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccg	actcaggcga	gggtctacatc	1560
55	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cgggtgatact	1620
	ctggctcaaga	acgtctcgag	ctggctgcagc	aacaccatcg	tctgcatcca	ctcggctcggc	1680
	ccggtcctcc	tgaccgattg	gtacgacaac	cccaacatca	cggccattct	ctgggctggg	1740
	cttcggggcc	aggagtgggg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
60	gcccggcgtc	cgcccttcac	ttggggcaag	accgcccga	gctatggcgc	ggagctcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttggggcggc	caacaggact	tcaccgaggg	cgctctcctc	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcggctc	tctacgagtt	cggccacggc	1980
	ctgagctaca	ccaccttcga	gtacagcaac	atccgctcgt	tcaagtccaa	cgctcagcag	2040
	taccggccca	cgaccggcac	cacgattcag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
65	ctcgaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttcccctaca	tcccgcagta	catctaccgc	2160

ES 2 455 269 T3

	tacctcaaca	cgaccgaccc	cgggagggcc	tggggcgatc	cccactacgg	ccagaccgcc	2220
	gaggagttec	tcccgcacca	cgccaccgat	gacgaccccc	agccgctcct	ccggctcctcg	2280
5	ggcggaaact	cccccgggcg	caaccgcccag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggaggtac	cgcagctcta	cgtctcgctg	2400
	ggcggctccc	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgcg	gatcgaaccc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cggccgcctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
	acgggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	cccaagacgg	catatggttg	gaggagcagc	2580
10	cggaagtgg	atctcaagat	tgagcttctc	tga			2613

SEQ ID NO:19 C1 Variante 885 polipéptido secuencia

15	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYPSP	WMNPNAIGWA	EAYAQAQKSPV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGAE	QCVGNVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGVRGSD	YNSAFPSPGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMGQE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEGF	APDPVLTGIG	180
	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHRFRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELKYLW	240
20	PFADAVRAGV	GSVMCSYNQG	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
	VAGLDMSPMG	DTMVNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMCMRIMAAL	FKVTKTTDLE	360
	PINFSPWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
	KPKFVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQARAIQD	480
25	GTRYESVLSN	YAEENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVNP	600
	AARSPFTWGK	TRESYGADVL	YKPNNGNWAP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVDD	DSVIYEFHG	660
	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTIQ	APTFGNFSTD	LEDYLFPKDE	FPYIPQYIYP	720
30	YLNTTDPARR	SGDPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPGGNRQ	LYDIVYTITA	780
	DITNTGSVVG	EEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLNWDV	840
	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIELP				870

SEQ ID NO:20 C1 Variant e916 cDNA secuencia

35	atgaaggctg	ctgcgcttcc	ctgcctcttc	ggcagtaacc	ttgcgcgttc	aggcgcatt	60
	gaatcgagaa	aggttcacca	gaagcccctc	gcgagatctg	aaccttttta	cccgtcgcca	120
	tggatgaatc	ccaacgccat	cggctggggc	gaggectatg	cccaggecaa	gtcctttgtc	180
40	tcccaaatga	ctctgctaga	gaaggtcaac	ttgaccacgg	gagtcggctg	ggggatggag	240
	cagtgcgctg	gccaaagtgg	cgcgatccct	cgccttggac	ttcgcagctc	gtgcatgcat	300

45

50

55

60

65

ES 2 455 269 T3

	gactcccctc	tggcggtgcg	aggagccgac	tacaactcag	cgttcccctc	tggccagacc	360
	gttgctgcta	cctgggatcg	cggtctgatg	taccgtcgcg	gctacgcaat	gggcccaggag	420
	gccaaaggca	agggcatcaa	tgtccttctc	ggaccagtcg	ccggccccct	tggccgcatg	480
5	cccgagggcg	gtcgtaactg	ggaaggcttc	gctccggatc	ccgtccttac	cggcatcggc	540
	atgtccgaga	cgatcaaggg	cattcaggat	gctggcgctca	tcgcttgtgc	gaagcacttt	600
	attggaaaacg	agcaggagca	cttcagacag	gtgccagaag	cccagggata	cggttacaac	660
	atcagcgaaa	ccctctcctc	caacattgac	gacaagacca	tgcaagagct	ctacctttgg	720
10	ccgtttgccg	atgccgtccg	ggcccggcgtc	ggctctgtca	tgtgctcgta	caaccagggc	780
	aacaactcgt	acgcctgccca	gaactcgaag	ctgctgaacg	acctcctcaa	gaacgagctt	840
	gggtttcagg	gcttgcgcat	gagcgactgg	tgggcacagc	aaactggcgc	agcaagcgcc	900
	gtggctggtc	tcgatatgtc	catgccgggc	gacaccatgc	tgaacactgg	cgtcagtttc	960
	tggggcgcca	atctcacctc	cgccgtcctc	aacggcacag	tccttgctta	ccgtctcgac	1020
15	gacatggcca	tgcgcatcat	ggccgccttc	ttcaagggtca	ccaagaccac	cgacctggaa	1080
	ccgatcaact	tctccttctg	gaccccgagc	acttatggcc	cgatccactg	ggccgccaag	1140
	cagggctacc	agggatttaa	ttcccacggt	gacgtccgcg	ccgaccacgg	caacctcatc	1200
	cggaaacattg	ccgccaaggg	tacgggtgctg	ctgaagaata	ccggctctct	acccctgaac	1260
20	aagccaaaagt	tcgtggccgt	catcggcgag	gatgctgggc	cgagccccaa	cgggccccaac	1320
	ggctgcagcg	accgcggctg	taacgaaggc	acgctcgcca	tgggctgggg	atccggcaca	1380
	gccaactatc	cgtaacctcg	ttccccgac	gcgcgctcc	aggcgcgggc	catccaggac	1440
	ggcaagaggt	acgagagcgt	cctgtccaac	tacgcccagg	aaaatacaaa	ggctctggtc	1500
	tcgcaggcca	atgcaaccgc	catcgtcttc	gtcaatgccg	actcaggcga	gggtacatc	1560
25	aacgtggacg	gtaacgaggg	cgaccgtaag	aacctgactc	tctggaacaa	cggtgatact	1620
	ctggtcaaga	acgtctcgag	ctggtgcagc	aacaccatcg	tcgtcatcca	ctcggctcggc	1680
	ccggtcctcc	tgaccgattg	gtacgacaac	cccaacatca	cggccattct	ctgggctggt	1740
	cttccggggc	aggagtccgg	caactccatc	accgacgtgc	tttacggcaa	ggtcaacccc	1800
30	gcccggcgt	cgcccttcac	ttggggcaag	accgcgaaa	gctatggcgc	ggacgtcctg	1860
	tacaagccga	ataatggcaa	ttggggcgcc	caacaggact	tcaccgaggg	cgctctcacc	1920
	gactaccgct	acttcgacaa	ggttgacgat	gactcgggtca	tctacgagtt	cggccacggc	1980
	ctgagctaca	ccaccttcga	gtacagcaac	atccgcgtcg	tcaagtcca	cgtcagcgag	2040
35	taccggccca	cgacggggcac	cacgattcag	gccccgacgt	ttggcaactt	ctccaccgac	2100
	ctcgaggact	atctcttccc	caaggacgag	ttccctaca	tcccgcagta	catctacccg	2160
	tacctcaaca	cgaccgacc	cgggagggcc	tggggcgatc	ccactacgg	ccagaccgcc	2220
	gaggagtcc	tcccggccca	cgccaccgat	gacgacccc	agccgctcct	ccggtcctcg	2280
	ggcggaaaact	cccccgggcg	caaccgccag	ctgtacgaca	ttgtctacac	aatcacggcc	2340
40	gacatcacga	atacgggctc	cgttgtaggc	gaggagggtac	cgcagcteta	cgtctcgcgtg	2400
	ggcgggtccc	aggatcccaa	ggtgcagctg	cgcgactttg	acaggatgcg	gatcgaaccc	2460
	ggcgagacga	ggcagttcac	cggccgcctg	acgcgcagag	atctgagcaa	ctgggacgtc	2520
	acggtgcagg	actgggtcat	cagcaggtat	cccaagacgg	catatggttg	gaggagcagc	2580
45	cggaaagtgg	atctcaagat	tgagcttcc	tga			2613

SEQ ID NO:21 C1 Variante 916 polipéptido secuencia

50	MKAAALSCLF	GSTLAVAGAI	ESRKVHQKPL	ARSEPFYSP	WMNPNAIGWA	EAYAQAQSFV	60
	SQMTLLEKVN	LTTGVGWGME	QCVGQVGAIP	RLGLRSLCMH	DSPLGVRGAD	YNSAFPSGQT	120
	VAATWDRGLM	YRRGYAMQOE	AKGKGINVLL	GPVAGPLGRM	PEGGRNWEGF	APDPVLTGIG	180
	MSETIKGIQD	AGVIACAKHF	IGNEQEHFRQ	VPEAQGYGYN	ISETLSSNID	DKTMHELYLW	240
	PFADAVRAGV	GSVMCSYNQG	NNSYACQNSK	LLNDLLKNEL	GFQGFVMSDW	WAQHTGAASA	300
55	VAGLDMSMPG	DTMLNTGVSF	WGANLTLAVL	NGTVPAYRLD	DMAMRIMAAL	FKVTKTTDLE	360
	PINFSPWTRD	TYGPIHWAAK	QGYQEINSHV	DVRADHGNI	RNIAAKGTVL	LKNTGSLPLN	420
	KPKFVAVIGE	DAGPSPNGPN	GCSDRGCNEG	TLAMGWGSGT	ANYPYLVSPD	AALQARAIQD	480
	GTRYESVLSN	YAEENTKALV	SQANATAIVF	VNADSGEGYI	NVDGNEGDRK	NLTLWNNGDT	540
60	LVKNVSSWCS	NTIVVIHSVG	PVLLTDWYDN	PNITAILWAG	LPGQESGNSI	TDVLYGKVNP	600
	AARSPFTWGK	TRESYGADVL	YKPNNGNWP	QQDFTEGVFI	DYRYFDKVED	DSVIYEFHG	660
	LSYTTFEYSN	IRVVKSNVSE	YRPTTGTTIQ	APTFGNFSTD	LEDYLPKDE	FPYIPQYIYP	720
	YLNTTDPARR	SGDPHYGQTA	EEFLPPHATD	DDPQPLLRSS	GGNSPGGNRQ	LYDIVYTTITA	780
	DITNTGSVVG	EEVPQLYVSL	GGPEDPKVQL	RDFDRMRIEP	GETRQFTGRL	TRRDLSNWDV	840
65	TVQDWVISRY	PKTAYVGRSS	RKLDLKIELP				870

Reivindicaciones

- 5 1. Una variante de polipéptido de β -glucosidasa aislada y/o recombinante que tiene mayor actividad y/o termoestabilidad que la proteína C1 natural (Bgl1) y que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente el 70 % idéntica a β -glucosidasa C1 natural (residuos 20-870 de SEC ID N°: 2) y tiene al menos una sustitución en la posición D369 en la que la posición se determina por alineamiento óptimo con SEC ID N°: 2.
- 10 2. La variante de polipéptido de β -glucosidasa según la reivindicación 1, en la que el aminoácido en la posición 369 está seleccionado del grupo que consiste en R, Q, L, Y, C, A, I, P, E, K, F, M, H y V, opcionalmente en la que, con respecto a una Bgl1 C1 nativa que comprende los aminoácidos 20-870 de SEC ID N°: 2, la variante tiene:
- 15 a) al menos 5 veces mayor termoactividad a aproximadamente pH 5 y aproximadamente 65 °C,
b) al menos 3 veces mayor termoestabilidad a aproximadamente pH 5 y aproximadamente 65 °C, o
c) tanto (a) como (b).
- 20 3. La variante de polipéptido de β -glucosidasa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la secuencia de aminoácidos incluye Q291W, D369R/H/L/Y y E402N y al menos una sustitución de un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Q258N/H, I106V, E385L, D274Y, K495H/I/N/Q, Q119E, Y135Q, G628W, N437I/V/W/D, S501R, Q313M, S434P y Y491F.
- 25 4. La variante de polipéptido de β -glucosidasa según la reivindicación 1 que tiene al menos el 70 % de identidad, al menos el 75 % de identidad, al menos el 80 % de identidad, al menos el 85 % de identidad, al menos el 90 % de identidad o al menos el 95 % de identidad con los residuos de aminoácidos 20-870 de SEC ID N°: 2 y comprende una sustitución de aminoácidos en la posición Q291, una sustitución de aminoácidos en la posición D369 y una sustitución de aminoácidos en la posición E402, como se determina con referencia a SEC ID N°: 2.
- 30 5. La variante de polipéptido de β -glucosidasa de la reivindicación 4, que comprende además al menos una sustitución de aminoácidos adicional en D47, A79, Q85, I106, A109, Q258, V260, Q313, F314, A343, S434, A475, K495, G628, A689, Y715 o A732, en la que la sustitución es opcionalmente D471, A79E/G/M, Q85N/H, I106V, A109/S/T, V260G, Q313M, F314L/V, A343C, S434P, A475L, K495N, G628W, A689I, Y715P o A732G, tal como en la que la variante comprende al menos una sustitución Q291W, D369R/L/H/Y o E402N.
- 35 6. La variante de polipéptido de β -glucosidasa de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que, con respecto a una Bgl1 C1 nativa que comprende los aminoácidos 20-870 de SEC ID N°: 2, la variante tiene:
- a) al menos 5 veces mayor termoactividad a aproximadamente pH 5 y aproximadamente 65 °C,
b) al menos 3 veces mayor termoestabilidad a aproximadamente pH 5 y aproximadamente 65 °C, o
c) tanto (a) como (b).
- 40 7. La variante de polipéptido de β -glucosidasa de cualquier reivindicación precedente que tiene al menos el 75 % de identidad, al menos el 80 % de identidad, al menos el 85 % de identidad, al menos el 90 % de identidad, al menos el 91 % de identidad, al menos el 92 % de identidad, al menos el 93 % de identidad, al menos el 94 % de identidad, al menos el 95 % de identidad, al menos el 96 % de identidad, al menos el 97 % de identidad, al menos el 98 % de identidad o al menos el 99 % de identidad con los residuos de aminoácidos 20-870 de SEC ID N°: 2.
- 45 8. La variante de polipéptido de β -glucosidasa según la reivindicación 1 que comprende los residuos de aminoácidos 20-870 de una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 17, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 7; SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 13; SEC ID N°: 15, SEC ID N°: 19 y SEC ID N°: 21.
- 50 9. Un ácido nucleico recombinante que codifica una variante de polipéptido de β -glucosidasa de cualquier reivindicación precedente, opcionalmente en el que el ácido nucleico codifica una preproteína que comprende la variante de Bgl1 fusionada con un péptido señal, opcionalmente el péptido señal Bgl1 C1 que se produce naturalmente.
- 55 10. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 9.
- 60 11. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 10, en la que dicho ácido nucleico está opcionalmente operativamente ligado a un promotor distinto del promotor de *Bgl1* C1, por ejemplo, en la que:
- a) la célula huésped es una especie de hongo filamentoso tal como una especie de *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Chrysosporium*, *Myceliophthora* o *Thielavia*; o
b) la célula huésped también expresa al menos un polipéptido de celulasa recombinante que no se produce naturalmente adicional, seleccionado de:
- 65 i) un polipéptido de endoglucanasa (EG) recombinante, y
ii) un polipéptido de celobiohidrolasa (CBH) recombinante.

- 5 12. Un procedimiento de producción de un polipéptido de Bgl1 que comprende cultivar una célula huésped de la reivindicación 11 en condiciones en las que se expresa la variante de Bgl1, tales como en las que la variante es secretada por la célula huésped, opcionalmente que comprende además una etapa de recuperar la variante de Bgl1 del medio en el que se cultiva la célula.
- 10 13. Una composición que comprende una variante de Bgl1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y al menos una polipéptido de celulasa recombinante que no se produce naturalmente adicional, seleccionado de
- 15 a) un polipéptido de endoglucanasa (EG) recombinante;
b) un polipéptido de celobiohidrolasa (CBH) recombinante; y
c) al menos un polipéptido de EG recombinante y al menos un polipéptido de CBH recombinante, opcionalmente:
- 20 i) que comprende además al menos un polipéptido seleccionado de un grupo de polipéptidos que consiste en una hemicelulasa, una pectinasa, una lignina peroxidasa, una manganeso peroxidasa, una lacasa y una celobiosa deshidrogenasa;
ii) en la que la celobiohidrolasa (CBH) y/o endoglucanasa (EG) es de *Trichoderma reesei*, *Myceliophthora thermophila* o *Streptomyces avermitilis*, o es una variante de una CBH o EG de *T. reesei*, CBH o EG de *M. thermophila* o una CBH o EG de *S. avermitilis*; o
iii) que comprende una célula huésped que expresa la variante de Bgl1.
- 25 14. El uso de una variante de Bgl1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en la producción de azúcares solubles de biomasa celulósica.
- 30 15. El uso de la reivindicación 14 que es un procedimiento de producción de glucosa que comprende combinar celobiosa con una variante de β -glucosidasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y opcionalmente al menos una celulasa adicional, en condiciones en las que se produce glucosa, por ejemplo, que comprende además:
- 35 a) cultivar un microorganismo en condiciones en las que la glucosa producida se usa como una fuente de energía y carbono para producir un producto metabólico; y
b) recuperar el producto metabólico,
- 40
45
50
55
60
65

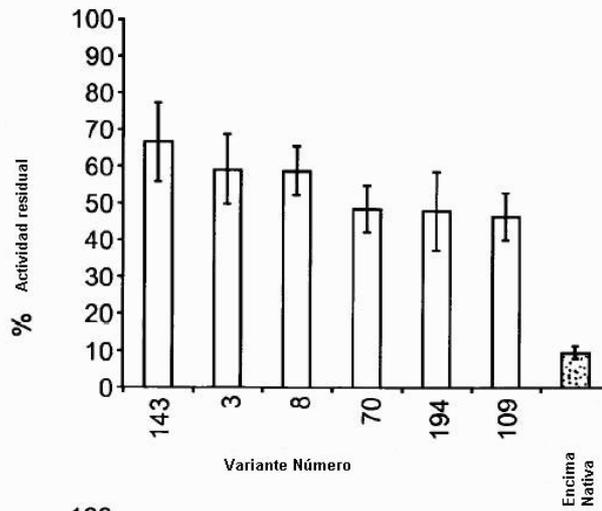


FIG. 1A

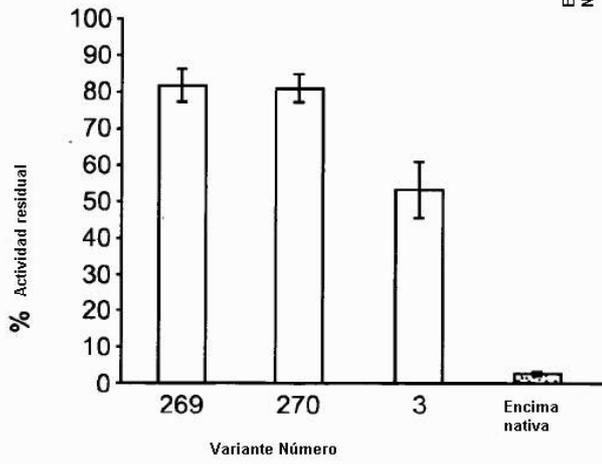


FIG. 1B

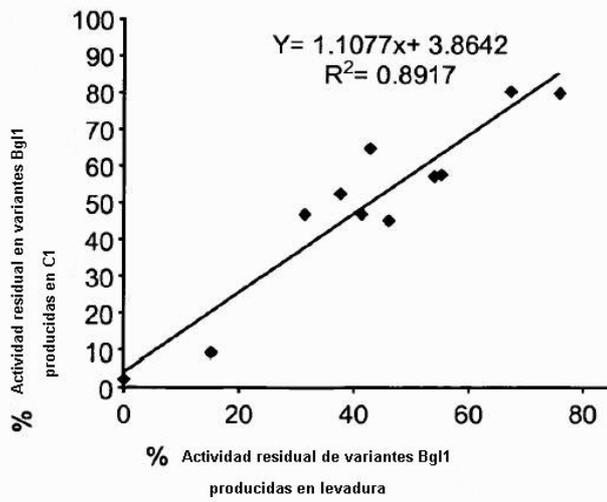


FIG. 1C

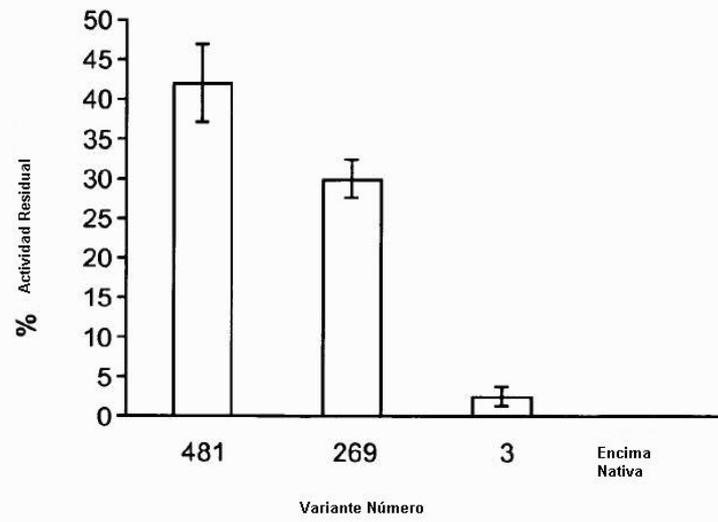


FIG. 2A

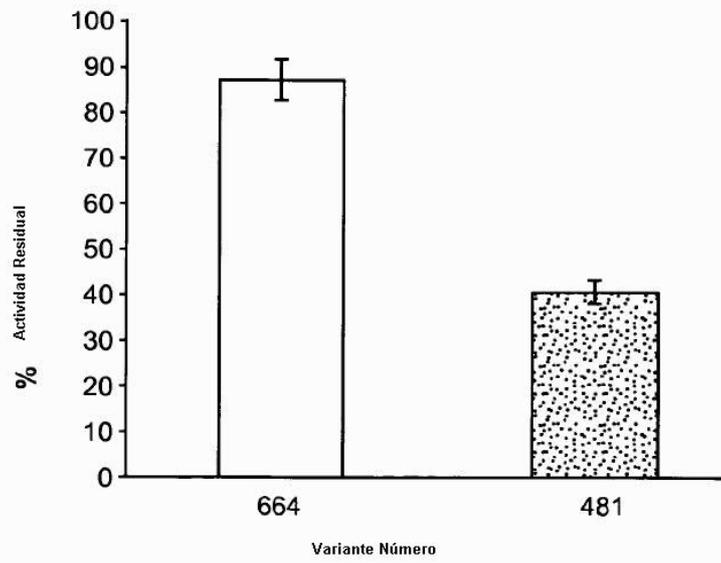


FIG. 2B

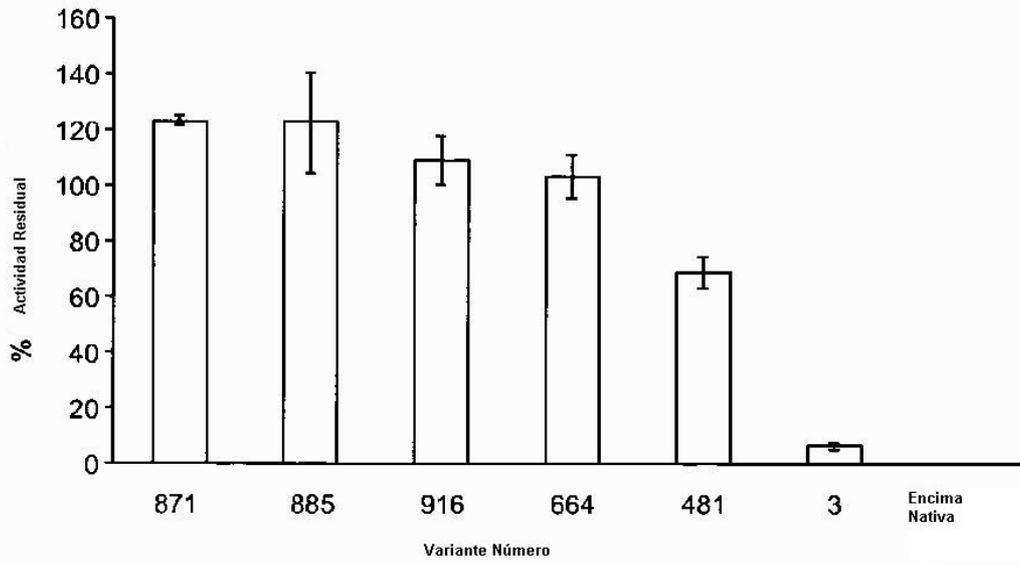


FIG. 3

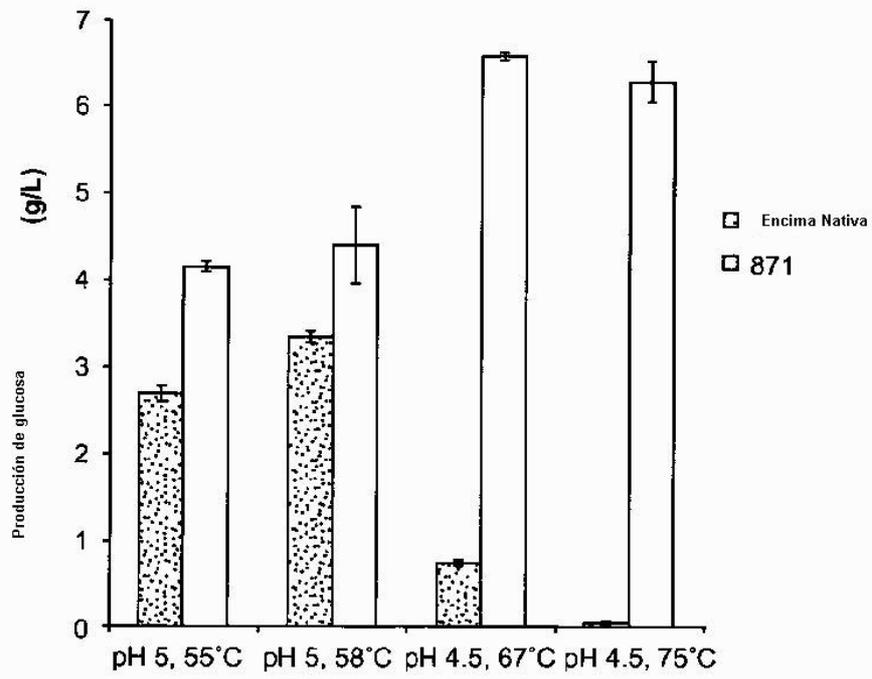


FIG. 4

		200
Variant885	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
Variant871	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
Variant269	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
Variant3	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
WT	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
Variant481	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
Variant647	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
Variant664	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
Variant916	(151)	GPVAGPLGRMPEGGRNWEFGFADPVLVTGIGMSETIKGIQDAGVIACAKHF
		250
Variant885	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
Variant871	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
Variant269	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
Variant3	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
WT	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
Variant481	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
Variant647	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
Variant664	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
Variant916	(201)	IGNEQEHFRQVPEAQGGYGYNISETLSSNIDDKTMHELYLWPFADAVRAGV
		300
Variant885	(251)	GSVMCSYNQGNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
Variant871	(251)	GSVMCSYNQGNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
Variant269	(251)	GSVMCSYNQVNNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
Variant3	(251)	GSVMCSYQQVNNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
WT	(251)	GSVMCSYQQVNNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
Variant481	(251)	GSVMCSYNQVNNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
Variant647	(251)	GSVMCSYNQVNNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
Variant664	(251)	GSVMCSYNQGNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA
Variant916	(251)	GSVMCSYNQGNNSYACQNSKLLNDLLKNEELGFQGFVMSDWWAQHTGAASA

FIG. 5 (Cont. 1)

			350
			301
Variant885	(301)	VAGLMSMPGDTMNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMCMRIMAAL	
Variant871	(301)	VAGLMSMPGDTMNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMCMRIMAAL	
Variant269	(301)	VAGLMSMPGDTMNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMAMRIMAAL	
Variant3	(301)	VAGLMSMPGDTQFNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMAMRIMAAL	
WT	(301)	VAGLMSMPGDTQFNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMAMRIMAAL	
Variant481	(301)	VAGLMSMPGDTMNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMAMRIMAAL	
Variant647	(301)	VAGLMSMPGDTMNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMCMRIMAAL	
Variant664	(301)	VAGLMSMPGDTMLNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMAMRIMAAL	
Variant916	(301)	VAGLMSMPGDTMLNTGVSFWGANLTLAVLNGTVPAYRLDDMAMRIMAAL	
			400
			351
Variant885	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTRDTYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
Variant871	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTRDTYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
Variant269	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTRDTYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
Variant3	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTLDYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
WT	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTLDYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
Variant481	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTRDTYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
Variant647	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTRDTYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
Variant664	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTRDTYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
Variant916	(351)	EKVTKTTDLEPIFNSFWTRDTYGPiHWAAKQGYQEIINSHVDVVRADHGnLI	
			450
			401
Variant885	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGPSPNGPngCCSDRGcNEG	
Variant871	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGPSPNGPngCCSDRGcNEG	
Variant269	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGPSPNGPngCCSDRGcNEG	
Variant3	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGSSPNGPngCCSDRGcNEG	
WT	(401)	REIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGSSPNGPngCCSDRGcNEG	
Variant481	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGPSPNGPngCCSDRGcNEG	
Variant647	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGPSPNGPngCCSDRGcNEG	
Variant664	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGPSPNGPngCCSDRGcNEG	
Variant916	(401)	RNIAAKGTVLLKNTGSLPLNKPfVAVIGEDAGPSPNGPngCCSDRGcNEG	

FIG. 5 (Cont. 2)

Variant885	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	500
Variant871	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
Variant269	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
Variant3	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
WT	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
Variant481	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
Variant647	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
Variant664	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
Variant916	(451)	TLAMGWGSGGTANYPYLVSPDAALQARAIQDGTTRYESVLSNYAEENTKALV	
Variant885	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	550
Variant871	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
Variant269	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
Variant3	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
WT	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
Variant481	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
Variant647	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
Variant664	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
Variant916	(501)	SQANATAIVFVNADSGEGYINVDGNEGDRKRLTLWNNGDTLVKNVSSWCS	
Variant885	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	600
Variant871	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	
Variant269	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	
Variant3	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	
WT	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	
Variant481	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	
Variant647	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	
Variant664	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	
Variant916	(551)	NTIVVIHSVGPVLLTDWYDNPINITAILWAGLPGQESGNSITDVLYGKVNP	

FIG. 5 (Cont. 3)

Variant885	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	650
Variant871	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
Variant269	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
Variant3	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
WT	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
Variant481	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
Variant647	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
Variant664	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
Variant916	(601)	AARSFFTGWGKTRESYGADVLYKPNNGNWAPQQDFTEGVFIDYRYFDKVVDD	
Variant885	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	700
Variant871	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
Variant269	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
Variant3	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
WT	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
Variant481	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
Variant647	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
Variant664	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
Variant916	(651)	DSVIYEFHGHLSTTFEYSNIRVVKSNVSEYRPTTGTTIQAPTFGNFSTD	
Variant885	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	750
Variant871	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	
Variant269	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	
Variant3	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	
WT	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	
Variant481	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	
Variant647	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	
Variant664	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	
Variant916	(701)	LEDYLFPKDEFFPIPQYIYPYLNTDPRRASGDPHYGQTAEFFLPPHATD	

FIG. 5 (Cont. 4)

