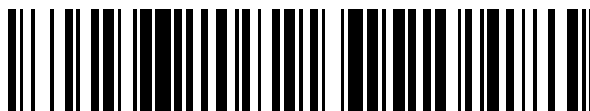


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 710**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2011 E 11750425 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015 EP 2543723**

54 Título: **Procedimiento para producir glucosidasa, composición enzimática y procedimiento de hidrólisis de biomasa**

30 Prioridad:

01.03.2010 JP 2010044242

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

03.09.2015

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome Chuo-ku
Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**KURIHARA, HIROYUKI;
WATANABE, SHIOMI;
YAMADA, KATSUSHIGE;
ISHIKAWA, KAZUHIKO;
WADA, YASUNOBU y
KADO, YUJI**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 544 710 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir glucosidasa, composición enzimática y procedimiento de hidrólisis de biomasa

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo, una composición enzimática que contiene esta enzima y un procedimiento para hidrolizar biomasa utilizando la composición enzimática.

10

Antecedentes técnicos

Diversas técnicas están disponibles para sacarificación de celulosa, entre las cuales un procedimiento de sacarificación enzimática, que utiliza condiciones de reacción suaves y consigue un rendimiento de azúcar elevado, se ha convertido en la corriente prevalente de desarrollo.

15

La celulasa, que es una enzima que degrada celulosa, se clasifica a groso modo en celobiohidrolasa, que actúa sobre las regiones cristalinas de la celulosa, y endoglucanasa, que reduce el peso molecular actuando desde dentro de la cadena molecular de celulosa. Se sabe que estas celulasas son inhibidas por la celobiosa, que es uno de los productos de la degradación de celulosa. Mientras tanto, la β -glucosidasa es una enzima que actúa sobre un oligosacárido soluble en agua o celobiosa y cataliza una reacción de hidrólisis del enlace β -glucosídico. Particularmente, la β -glucosidasa es una enzima necesaria para la adquisición de abundante glucosa, que es útil como materia prima para la fermentación. Además, es conocido que las reacciones mediadas por celobiohidrolasa o endoglucanasa son inhibidas por la acumulación de celobiosa, que es producida por la degradación de celulosa. Es decir, la β -glucosidasa tiene un efecto de mejorar enormemente la eficiencia de degradación de celulosa, debido a su capacidad de reducir drásticamente la acumulación de celobiosa producida por la degradación de celulosa.

20

25

La celulosa está contenida abundantemente en plantas herbáceas y plantas leñosas, que se denominan colectivamente biomasa celulósica. La biomasa celulósica contiene, además de celulosa, hemicelulosa tal como xilano y arabinano, y lignina. Particularmente, siendo un compuesto polimérico aromático, se sabe que la lignina contenida en la biomasa celulósica actúa de manera inhibidora en la sacarificación enzimática por celulasa derivada de hongos filamentosos. Aunque el mecanismo de inhibición de celulasa derivada de hongos filamentosos por lignina aún no ha sido completamente elucidado, la eficiencia de degradación reducida causada por la adsorción de celulosa a lignina se ha propuesto como una de las causas (bibliografía no de patentes 1).

35

Una enzima termorresistente es altamente estable y conserva su actividad durante un largo periodo incluso en condiciones de alta temperatura; por lo tanto, la aplicación de una enzima termorresistente como una enzima industrial está siendo estudiada. Un gran número de enzimas termorresistentes han sido confirmadas entre las enzimas poseídas por termófilos o hipertermófilos.

40

También con respecto a β -glucosidasa termorresistente, ésta ha sido identificada a partir de varias especies de termófilos o hipertermófilos. Específicamente, la β -glucosidasa termorresistente ha sido identificada a partir de organismos tales como *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus horikoshii*, *Thermotoga maritima*, *Sulfolobus shibatae* y *Clostridium thermocellum*.

45

Se sabe que la celulasa o β -glucosidasa derivadas de hongos filamentosos están glucosiladas (bibliografía no de patentes 2). Como función general de una cadena de azúcares en dicha proteína glucosilada, se conocen efectos tales como mejorar la solubilidad de la proteína, mejorar la estabilidad física y mejorar la resistencia a proteasa (bibliografía no de patentes 3). Como función otorgada por la posesión de una cadena de azúcares por una enzima de sacarificación tal como celulasa, se da a conocer que la glucosilación de xilanasa con cadenas de azúcares unidas a N da como resultado un nivel de expresión incrementado de xilanasa (bibliografía de patentes 1).

50

Lista de menciones

55 Bibliografía de patentes

Bibliografía de patentes 1: WO/2005/093072

Bibliografía no de patentes

60

Bibliografía no de patentes 1: Hetti P. y otros, Journal of Biotechnology, 107, 65 a 72 (2004)

Bibliografía no de patentes 2: Christian P. y otros, Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics., vol. 1, 121 a 138 (1998)

Bibliografía no de patentes 3: H. Ohba y otros, Biosci. Biotech. Biochem., 59, 1581 a 1583 (1995)

65

Características de la invención

Problema técnico

- 5 Un objetivo de la presente invención es dar a conocer una glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo y, además, dar a conocer una composición enzimática que muestra eficiencia de degradación elevada en el proceso de hidrólisis de celulosa, particularmente lignocelulosa que contiene lignina, mezclando la glucosidasa anterior y celulasa.

10 Solución al problema

Los inventores de la presente invención llevaron a cabo una investigación intensiva para conseguir el objetivo mencionado anteriormente. Como resultado, han descubierto que una glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo puede aplicarse a la degradación de celulosa.

- 15 Es decir, la presente invención se compone de los siguientes medios técnicos.

(1) Un procedimiento para producir una glucosidasa mutante derivada de un termófilo que tiene fijada selectivamente a ella una cadena de azúcares y también tiene una actividad glucosidasa, que comprende:

- 20 (i) preparar ADN que codifica una glucosidasa mutante derivada de un termófilo introduciendo una secuencia de ADN que codifica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (en las que, X es un aminoácido excepto prolina) en ADN que codifica una glucosidasa derivada de un termófilo que está originalmente desprovista de una secuencia de glucosilación y, además, añadir una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal de secreción al ADN que codifica la glucosidasa mutante,
- 25 (ii) introducir el ADN que codifica la glucosidasa mutante al que se le ha añadido la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de secreción en un microorganismo eucariota, de modo que una glucosidasa mutante codificada por el ADN de la glucosidasa mutante se exprese como una proteína secretora, y
- 30 (iii) aislar y purificar la glucosidasa mutante expresada de este modo como una proteína secretora.

(2) El procedimiento para producir una glucosidasa mutante, según (1), en el que la cadena de azúcares es una cadena de azúcares de tipo rica en manosa.

(3) El procedimiento para producir una glucosidasa mutante, según (1) o (2), en el que la glucosidasa derivada de un termófilo es una glucosidasa derivada de un termófilo seleccionado entre el grupo que comprende el género *Sulfolobus*, el género *Thermoplasma*, el género *Caldivirgra*, el género *Thermosphaera*, el género *Pyrococcus*, el género *Picrophilus*, el género *Caldivirgra* y el género *Fervidobacterium*.

(4) El procedimiento para producir una glucosidasa, según cualquiera de (1) a (3), en el que la glucosidasa derivada de un termófilo es una proteína que comprende:

- 40 (i) una secuencia de aminoácidos igual que cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o
- 45 (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene el 85% o más de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, y también una actividad β -glucosidasa.

(5) El procedimiento para producir una glucosidasa mutante, según cualquiera de (1) a (4), en el que el microorganismo eucariota es *Pichia pastoris*.

(6) El procedimiento para producir una glucosidasa mutante, según cualquiera de (1) a (5), en el que la secuencia señal de secreción es una secuencia señal de secreción de factor α .

(7) El procedimiento para producir una glucosidasa mutante, según cualquiera de (1) a (6); en el que la glucosidasa mutante derivada de un termófilo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56.

55 (8) Una composición enzimática para sacarificación de biomasa que comprende celulasa y la glucosidasa mutante derivada de un termófilo obtenida mediante el procedimiento de producción, según cualquiera de (1) a (7).

(9) La composición enzimática para sacarificación de biomasa, según (8), en la que la celulasa es una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos.

60 (10) La composición enzimática para sacarificación de biomasa, según (8) o (9), en la que la mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos es una mezcla de celulasas derivadas del género *Trichoderma*.

(11) Un procedimiento para hidrolizar biomasa, que comprende utilizar la composición enzimática, según cualquiera de (8) a (10).

65 (12) El procedimiento para hidrolizar biomasa, según (11), que comprende filtrar una hidrolasa obtenida por la composición enzimática mencionada anteriormente a través de una membrana de ultrafiltración, y separar y recuperar la composición enzimática utilizada.

La presente memoria descriptiva abarca el contenido descrito en la memoria descriptiva y/o los dibujos de la solicitud de patente japonesa No. 2010-044242, en base a la cual la presente solicitud reivindica prioridad.

5 Efectos ventajosos de la invención

En comparación con la utilización de una glucosidasa derivada de un termófilo con una mezcla de celulasa no glucosilada, la glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo obtenida mediante la presente invención puede conseguir mayor eficiencia de degradación de celulosa en la hidrólisis de biomasa celulósica. Este efecto es prominente particularmente en la hidrólisis de lignocelulosa. Además, la glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo, según la presente invención, tiene baja capacidad de adsorción para biomasa celulósica, particularmente para lignocelulosa, y para una membrana de ultrafiltración, y también para una membrana de ultrafiltración utilizada para la separación de una solución de azúcar del hidrolizado y, de este modo, consigue una excelente recuperación de enzimas del hidrolizado.

15 Descripción breve de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra un alineamiento de una β -glucosidasa derivada de *Pyrococcus furiosus* (PfuBGL) mostrada en SEQ ID NO: 4, una β -glucosidasa derivada de *Trichoderma reesei* (TriReBGL) mostrada en SEQ ID NO: 1 y una β -glucosidasa derivada de *Aspergillus niger* (AspNgBGL) mostrada en SEQ ID NO: 2 en el ejemplo 1. La secuencia de glucosilación en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 estaba subrayada, y el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación (H60, L61 y Y62) en SEQ ID NO: 4 estaba subrayada de forma similar.

[Figura 2-1] La figura 2-1 muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (gPfuBGL) y las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (ThAggBGY), SEQ ID NO: 10 (CmGHFP), SEQ ID NO: 12 (SaBGAL), SEQ ID NO: 14 (SsoBGAL), SEQ ID NO: 16 (PtBGAL), SEQ ID NO: 18 (TvBGAL) y SEQ ID NO: 20 (FnGHFP) en el ejemplo 2. La secuencia de glucosilación Asn-Arg-Thr (N-R-T) insertada en la secuencia de SEQ ID NO: 6 estaba subrayada. Además, el sitio correspondiente al sitio de glucosilación Asn-Arg-Thr (N-R-T) en la secuencia de SEQ ID NO: 6 en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20 estaba subrayado de forma similar.

[Figura 2-2] La figura 2-2 es una continuación de la figura 2-1.

[Figura 3] La figura 3 es un diagrama que muestra el patrón de bandas de electroforesis en gel de poliacrilamida para PfuBGL (izquierda) preparada en el ejemplo comparativo 1 y la PfuBGL mutante glucosilada preparada en el ejemplo 2 sin tratamiento con EndoH (derecha) y con tratamiento con EndoH (centro). Se confirma una reducción del peso molecular de la PfuBGL mutante glucosilada mediante tratamiento con EndoH.

[Figura 4] La figura 4 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la cantidad de glucosa producida por degradación de celobiosa mediante PfuBGL en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 4.

[Figura 5] La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la cantidad de glucosa producida por degradación de celobiosa mediante la PfuBGL mutante glucosilada en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 4.

[Figura 6] La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de la comparación de los cambios de la cantidad de glucosa producida entre el caso en el que a una composición enzimática que contenía una celulasa derivada del género *Trichoderma* + la PfuBGL mutante glucosilada se le permitió actuar sobre el sustrato de lignocelulosa y el caso en el que a una composición enzimática que contenía una celulasa derivada del género *Trichoderma* + PfuBGL se le permitió actuar sobre el sustrato de lignocelulosa en el ejemplo 5. Como sustrato, se utilizó lignocelulosa al 5% en peso, y se dejó proseguir a las reacciones hasta 28 horas a 50°C, y el producto de reacción se muestreó según era apropiado y se midió para conocer la concentración de glucosa. Se añadió celulasa a 0,5 mg/ml y se añadió glucosidasa a 0,005 mg/ml (1/100 de la cantidad de celulasa).

[Figura 7] La figura 7 es un diagrama que muestra la estructura básica de una cadena de azúcares unida a N. En la estructura básica de una cadena de azúcares unida a N, dos residuos de N-acetilglucosamina y, además, tres residuos de manosa están unidos a la cadena lateral de Asn de una glucosidasa derivada de un termófilo.

[Figura 8] La figura 8 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de AggBGY (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 9] La figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de la AggBGY mutante glucosilada (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 10] La figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de CmGHFP (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 11] La figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de la CmGHFP mutante glucosilada (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 12] La figura 12 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de SaBGAL (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 13] La figura 13 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de la SaBGAL mutante glucosilada (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 14] La figura 14 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de SsoBGAL (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 15] La figura 15 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de la SsoBGAL mutante glucosilada (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 16] La figura 16 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de PtBGAL (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 17] La figura 17 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de la PtBGAL mutante glucosilada (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 18] La figura 18 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de TvBGAL (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 19] La figura 19 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de la TvBGAL mutante glucosilada (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 20] La figura 20 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de FnGHFP (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

[Figura 21] La figura 21 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de estabilidad térmica de la enzima midiendo los cambios de la actividad residual de la FnGHFP mutante glucosilada (valor relativo a 0 horas de calentamiento) en degradación de celobiosa en un tiempo de retención de calor de 50 a 90°C en el ejemplo 12.

Descripción de realizaciones

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle.

La “glucosidasa” en la presente invención se refiere a una enzima que tiene una actividad de hidrolizar un disacárido que tiene un enlace β -glucosídico (es decir, la actividad β -glucosidasa). Aunque un grupo de enzimas pertenecientes a β -glucosidasa se enumera en la comisión enzimática (*Enzyme Commission*) (EC) No: EC 3.2.1.21, una proteína que no pertenece a β -glucosidasa en términos de número de la EC pero que tiene la actividad β -glucosidasa mencionada anteriormente, también está abarcada por glucosidasa en la presente invención. Los ejemplos de la glucosidasa incluyen galactosidasa, manosidasa y una proteína de la familia de enlace glucosídico hidrolasa.

En la presente invención, un termófilo es un término genérico para un grupo de microorganismos que pueden vivir a 50°C o más y, particularmente, un hipertermófilo se refiere a un grupo de microorganismos que pueden vivir a 80°C o más. Los ejemplos del termófilo incluyen el género *Sulfolobus*, el género *Thermoplasma*, el género *Calditerrivra*, el género *Thermosphaera*, el género *Pyrococcus*, el género *Picrophilus*, el género *Calditerrivra* y el género *Fervidobacterium*.

La glucosidasa derivada de un termófilo es conocida públicamente y, por ejemplo, está registrada en el GenBank como NP_577802, que puede utilizarse en la presente invención. Preferentemente, la glucosidasa derivada de un termófilo tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. Más preferentemente, la glucosidasa derivada de un termófilo consta de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20. En la presente invención, la glucosidasa derivada de un termófilo también abarca una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 que ha sido sometida a una o múltiple delección, sustitución, adición o inserción, o delección, sustitución, adición o inserción de uno o una pluralidad de aminoácidos, y que tiene una actividad β -glucosidasa. En este caso, el alcance de “uno o una pluralidad” no está particularmente limitado; sin embargo, es preferentemente 10 o menos, más preferentemente cinco o menos, de forma particularmente preferente cuatro o menos, o uno o dos. Además, en la presente invención, la glucosidasa derivada de un termófilo también abarca una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos con el 85% o más, más preferentemente el 90% o más, y de la forma más preferente el 95% o más de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 según el cálculo utilizando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) en el National Center for Biological Information y similares (por ejemplo, parámetro o parámetros por defecto, es decir, el parámetro o parámetros establecidos inicialmente), que constan, preferentemente, de la secuencia de aminoácidos anterior, y que tiene la actividad β -glucosidasa. En este caso, el término “identidad” se refiere al porcentaje de los residuos de aminoácidos idénticos y aminoácidos homólogos con respecto a los residuos de aminoácidos totales solapantes en el alineamiento óptimo cuando dos secuencias de aminoácidos se alinean con o sin un espacio introducido entre las secuencias de aminoácidos. La identidad puede obtenerse usando un procedimiento conocido habitualmente por los expertos en la materia,

software de análisis de secuencia (un algoritmo conocido públicamente tal como BLAST y FASTA), y similares. La “actividad β -glucosidasa” es tal como se ha definido anteriormente, y esta actividad puede medirse, por ejemplo, añadiendo una solución enzimática a una solución de sustrato de celobiosa obtenida disolviendo celobiosa en un tampón de ácido acético - acetato sódico 50 mM (pH 5,0), permitiendo a la reacción proseguir de 30 a 85°C durante 30 minutos, finalizando la reacción cambiando el pH según sea necesario, y cuantificando la concentración de glucosa en la solución de reacción resultante utilizando un kit de cuantificación de glucosa.

En la presente invención, la “glucosidasa derivada de un termófilo” no abarca una glucosidasa que tiene de forma natural una secuencia de glucosilación en su secuencia de aminoácidos, y está limitada a una glucosidasa que está desprovista de forma natural de una secuencia de glucosilación.

Una “cadena de azúcares”, tal como se utiliza en la presente invención, tiene una estructura en la que monosacáridos están unidos mediante un enlace glucosídico, y está unida de forma terminal a la cadena lateral de aminoácidos de la secuencia peptídica de la glucosidasa derivada de un termófilo mediante la formación de enlaces covalentes. La presencia o ausencia de “cadena de azúcares” puede confirmarse tiñendo glucosidasa separada por electroforesis SDS mediante una reacción ácido-base de Schiff (PAS) periódica conocida en general.

Una cadena de azúcares se clasifica principalmente en una cadena de azúcares unida a N, que se une a la cadena lateral de asparagina, y una cadena de azúcares unida a O, que se une a las cadenas laterales de serina y treonina, y la cadena de azúcares es, preferentemente, una cadena de azúcares unida a N. Para una cadena de azúcares unida a N, una estructura que tiene un esqueleto básico que tiene dos residuos de N-acetilglucosamina y tres residuos de manosa con respecto a la cadena lateral de asparagina se da como ejemplo (figura 7). Las moléculas de azúcar están unidas adicionalmente a esta estructura básica mediante la acción enzimática, con lo que se componen diversas cadenas de azúcares. La estructura de la cadena de azúcares varía dependiendo del tipo de microorganismo utilizado como huésped, la condición de cultivo del huésped y similares. La glucosidasa derivada de un termófilo glucosilada se refiere a un compuesto al que están fijadas diversas estructuras de cadena de azúcares.

Si la cadena de azúcares unida a la glucosidasa derivada de un termófilo está unida a N o unida a O puede confirmarse, por ejemplo, permitiendo que cada una de glucanasa unida a N que hidroliza específicamente la sección terminal de una cadena de azúcares unida a N y glucanasa unida a O que hidroliza específicamente la sección terminal de una cadena de azúcares unida a O para actuar sobre la glucosidasa, realizando electroforesis SDS, y a continuación comparando los cambios del peso molecular de la glucosidasa. Como la glucanasa unida a N empleada en este caso, pueden utilizarse N-glucosidasa F derivada de *Flavobacterium meningosepticum* (PNGasaF), endo- β -N-acetilglucosaminidasa derivada de *Streptomyces plicatus*, y similares. Además, como la glucanasa unida a O, pueden utilizarse endo- α -N-acetilgalactosaminidasa derivada de *Streptococcus* y similares.

La cadena de azúcares en la glucosidasa mutante de la presente invención es, preferentemente, una de tipo rica en manosa. En este caso, la expresión “de tipo rica en manosa” se refiere a una cadena de azúcares unida a N en la que cuatro o más residuos de manosa están unidos por dos residuos de N-acetilglucosamina o residuos de glucosamina que componen la cadena de azúcares. Como el azúcar diferente de manosa, pueden estar contenidos otros monosacáridos tales como glucosa. Cuando está contenida glucosa, ésta está normalmente unida al extremo no reductor de manosa de una cadena de azúcares de tipo rica en manosa.

Los ejemplos de una cadena de azúcares unida a N diferentes de una de tipo rica en manosa incluyen una cadena de azúcares de tipo de complejo. Un tipo de complejo se caracteriza por contener, como azúcar diferente de manosa y N-acetilglucosamina, diversos tipos de azúcares tales como fructosa y ácido siálico como sus componentes. En comparación con una de tipo rica en manosa, la relación de N-acetilglucosamina en una cadena de azúcares se incrementa, y la relación de manosa con respecto a dos residuos de N-acetilglucosamina es de tres o menos.

Si una cadena de azúcares unida a N dada es o no una de tipo rica en manosa o un tipo híbrido puede confirmarse, por ejemplo, transfiriendo glucosidasa que se ha sometido a electroforesis a una membrana de PVDF, haciéndole reaccionar con lectina específica de cadena de azúcares, y examinando el desarrollo de color. Los ejemplos de la lectina específica de cadena de azúcares utilizados en este caso incluyen Concanavalina A (ConA), lectina de *Ricinus communis* (RCA12), lectina de *Ulex europaeus* (UEA-1) y lectina de cacahuete (PNA). Si la glucosidasa se tiñe con ConA, puede confirmarse como una cadena de azúcares unida a N de tipo rica en manosa, mientras que si se tiñe con RCA120, puede confirmarse como una cadena de azúcares unida a N de tipo híbrido. Además, como otra técnica de valoración, la estructura de la cadena de azúcares puede confirmarse separando el azúcar que compone la cadena de azúcares de glucosidasa purificada suficientemente y cuantificando el componente monosacárido del azúcar separado de este modo analizándolo con MALDI-TOF/MS o HPLC.

La “secuencia de glucosilación” se refiere a la secuencia de aminoácidos de la parte que es sometida a glucosilación en el proceso de expresión y traducción en un organismo eucariota.

Los ejemplos de la secuencia de glucosilación incluyen la secuencia consenso de una cadena de azúcares unida a N, que es Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (en las que, X es un aminoácido excepto prolina), y la secuencia consenso de una cadena de azúcares unida a O, que es Cys-X-Ser-X-Pro-Cys (en la que, X es un aminoácido excepto prolina); sin

embargo, la secuencia de glucosilación no está limitada a éstas. Preferentemente, la secuencia de glucosilación es la secuencia consenso de una cadena de azúcares unida a N. En este caso, los ejemplos de aminoácido excepto prolina incluyen Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Met, Cys, Ser, Thr, Asp, Glu, His, Lys, Arg, Asn y Gln.

La glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo, según la presente invención, (a continuación, en el presente documento, denominada como "glucosidasa mutante") se refiere a una glucosidasa mutante que resulta de la introducción de la secuencia de aminoácidos que compone la secuencia de glucosilación mencionada anteriormente en la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente de una glucosidasa derivada de un termófilo, en la que la secuencia de aminoácidos se glucosila selectivamente. Pueden introducirse una o dos o más secuencias de glucosilación, y estas secuencias pueden ser todas iguales o contener múltiples tipos de secuencias de glucosilación.

Como sitio de introducción de la secuencia de glucosilación, se selecciona preferentemente una posición tal que no inactiva la actividad enzimática original mediante la introducción. El procedimiento para determinar dicho sitio de introducción de la secuencia de glucosilación puede llevarse a cabo mediante las siguientes etapas 1) y etapa 2).

Etapla 1) Realizar el análisis de alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre una glucosidasa derivada de hongos filamentosos que posee de forma natural una secuencia de glucosilación y una glucosidasa derivada de un termófilo que está desprovista de forma natural de una secuencia de glucosilación para aclarar una relación posicional relativa de la secuencia de glucosilación de la glucosidasa derivada de hongos filamentosos en la glucosidasa derivada de un termófilo para especificar el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación. Como herramienta de alineamiento, pueden usarse muchos softwares bien conocidos tales como ClustalW. La glucosidasa derivada de hongos filamentosos que posee de forma natural una secuencia de glucosilación es, preferentemente, una glucosidasa derivada del género *Trichoderma* o una glucosidasa derivada del género *Aspergillus*. Las secuencias de aminoácidos de estas glucosidasas derivadas de hongos filamentosos son conocidas públicamente y, preferentemente, se utiliza una β -glucosidasa derivada de *Trichoderma reesei* que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una β -glucosidasa derivada de *Aspergillus niger* que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

Etapla 2) A continuación, confirmar si el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en la glucosidasa derivada de un termófilo que ha sido especificada por el análisis de alineamiento mencionado anteriormente está presente sobre la superficie de la enzima. Si ésta está o no presente sobre la superficie de la enzima puede averiguarse utilizando la estructura cristalina de la glucosidasa derivada de un termófilo objetivo. Dicha estructura cristalina puede recuperarse de una base de datos tal como Protein Data Bank si es conocida. Además, una estructura cristalina puede obtenerse realizando en realidad cristalografía por rayos X, etc.

En la presente invención, el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación se selecciona, preferentemente, de acuerdo con la etapa 1) y la etapa 2) mencionadas anteriormente; sin embargo, como otra técnica, puede seleccionarse de acuerdo con la etapa 3) y la etapa 4) siguiente.

Etapla 3) Obtener el área superficial accesible (ASA) ($\text{\AA}^2$) del residuo de aminoácido mediante software analítico y, en base al valor obtenido de este modo, seleccionar el residuo de aminoácido que está expuesto cerca de la superficie de la glucosidasa derivada de un termófilo. El ASA de cada residuo de aminoácido puede calcularse utilizando software analítico de ASA tal como AREAIMOL (paquete ccp4) (Collaborative Computing Project Number 4 (CCP4) of UK Science and Engineering Research Council) ("Proyecto colaborativo de computación número 4 (CCP4) del consejo de investigación de ciencia e ingeniería del RU"), SURFace (grupo Barry Honig, the Department of Biochemistry and Molecular Biophysics and Center of Computational Biology and Bioinformatics of Columbia ("Departamento de bioquímica y biofísica molecular y centro de biología computacional y bioinformática de Columbia"), y ASAP (Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland y the ARC Centre in Bioinformatics) ("Instituto de biociencia molecular, Universidad de Queensland y centro ARC de bioinformática"), todos los cuales pueden obtenerse de páginas web. Si se calcula que un residuo de aminoácido tiene un ASA de $1 \text{ \AA}^2$ o mayor, entonces se supone que está expuesta a la superficie, y como sitio de introducción de la secuencia de glucosilación, se selecciona preferentemente un residuo de aminoácido con un ASA de $2 \text{ \AA}^2$ o más. Particularmente, para introducir los tres residuos de aminoácidos (Asn-X-Ser o Asn-X-Thr: X es un aminoácido excepto prolina), que forman la secuencia consenso para una cadena de azúcares unida a N, es preferente seleccionar una parte que contiene tres o más aminoácidos consecutivos con un ASA de $2 \text{ \AA}^2$ o más.

Etapla 4) Seleccionar, de entre los sitios de introducción de la secuencia de glucosilación en una glucosidasa derivada de un termófilo seleccionada mediante la etapa 3) anteriormente, una posición que está demasiado lejos del sitio activo de la enzima de la glucosidasa derivada de un termófilo para causar una reducción de la actividad enzimática mediante introducción de la secuencia de glucosilación. La distancia desde el sitio activo de la enzima puede averiguarse utilizando la estructura cristalina de la glucosidasa derivada de un termófilo objetivo de una manera similar a la anterior. Específicamente, después de excluir los residuos de aminoácidos dentro de una distancia de $3,5 \text{ \AA}$ desde el sitio activo de la enzima, se selecciona preferentemente el residuo de aminoácido que está más alejado que esta distancia.

Por ejemplo, la aplicación de la etapa 3) y la etapa 4) mencionadas anteriormente a PfuBGL representada mediante la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 será de la siguiente manera. En primer lugar, utilizando AREAIMOL (paquete ccp4), se calcula el ASA suponiendo que la molécula de disolvente tiene 1,4 Å, y el residuo de aminoácido con un ASA de 2 Å² o más es excluido (Tabla 1 (i)). Posteriormente, se extrae una parte que contiene tres o más aminoácidos consecutivos con un ASA de 2 Å² o más (Tabla 1 (ii)). Además, en base a la información de la estructura cristalina de PfuBGL, se especifican los residuos de aminoácidos dentro de una distancia de 3,5 Å del sitio activo de la enzima (23 residuos de S13, R78, N207, I263, I303, G304, V305, N306, Y307, S343, D344, L367, I370, I371, T372, D378, R384, Y387, H391, D404, V405, R406, N407, Y408, L409, H410, W411 y F427) y a continuación se excluyen. Como resultado, puede seleccionarse el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación (Tabla 1 (iii)).

[Tabla 1]

Ejemplo de selección del sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en PfuBGL	
(i) Residuos de aminoácidos con un ASA de 2 Å ² o más	
M1-M9, F17-F19, G22-G25, E27-V34, H37-E40, I42-L51, E53, N54, Y58-Q64, D67, I68, E70, I68, E70, K71, G73, D75, E82-R85, P88-P90, F92-D110, P112-115, K117, E118, E120-A127, E129, H130, R132, K133, S136, D137, K139-F145, Y150-W152, P155-D160, I162, A163, R165-L167, P169-P173, W176-T181, V183, E184, K187, Y194, H195, D197-L199, D201, M202, E208, N210-Q215, Y217-S222, F224, P225, G227-K236, K238-N240, I242, I246, Y249, D250, K253-S259, A265-E279, E281-D287, E289, T292, I293, H295-W302, Y308, R310-Y313, A315-Y326, F328-R340, D344, F345, W374, Y350-E352, E355, N356, K359, Y360, N362-P368, I370, E373, M376, A379-Y383, P385-Y387, S390, K363, A394, Y396, N397, M399-R406, W411, E418-Q421, F423-F427, Y431, D433, P443, L446, R449, E450, T453-E460, A462-K473	
(ii) Entre (i), una parte que contiene tres o más residuos de aminoácidos consecutivos	
M1-M9, F17-F19, G22-G25, E27-V34, H37-E40, I42-L51, Y58-Q64, E82-R85, P88-P90, F92-D110, P112-115, E120-A127, K139-F145, Y150-W152, P155-D160, R165-L167, P169-P173, W176-T181, D197-L199, N210-Q215, Y217-S222, G227-K236, K238-N240, K253-S259, A265-E279, E281-D287, H295-W302, R310-Y313, A315-Y326, F328-R340, Y350-E352, N362-P368, A379-Y383, P385-Y387, M399-R406, E418-Q421, F423-F427, T453-E460, A462-K473	
(iii) Entre (ii), un residuo de aminoácido alejado del sitio activo de la enzima 3,5 Å o más	
M1-M9, F17-F19, G22-G25, E27-V34, H37-E40, I42-L51, Y58-Q64, E82-R85, P88-P90, F92-D110, P112-115, E120-A127, K139-F145, Y150-W152, P155-D160, R165-L167, P169-P173, W176-T181, D197-L199, N210-Q215, Y217-S222, G227-K236, K238-N240, K253-S259, A265-E279, E281-D287, H295-W302, R310-Y313, A315-Y326, F328-R340, Y350-E352, N362-E366, A379-Y383, M399-A403, E418-Q421, F423-R426, T453-E460, A462-K473	

El sitio de introducción de la secuencia de glucosilación está presente en un sitio o, preferentemente, en de dos a cinco sitios.

En la presente invención, el término “introducción” indica que la secuencia de glucosilación mencionada anteriormente se traduce en un polipéptido. Es decir, en la secuencia de aminoácidos original de una glucosidasa derivada de un termófilo, la secuencia de glucosilación mencionada anteriormente puede sustituir a la secuencia de aminoácidos existente, o puede insertarse en la secuencia de aminoácidos existente. Es decir, en el caso de sustitución, la longitud del polipéptido permanece inalterada con respecto a antes de la mutación, mientras que en el caso de inserción, la longitud del polipéptido se vuelve más larga por la longitud de la secuencia de glucosilación insertada. Sin embargo, desde el punto de vista de retención de la actividad enzimática, la introducción de la secuencia de glucosilación preferentemente tiene lugar mediante sustitución de la secuencia de aminoácidos existente.

Además, como la secuencia de glucosilación a introducir, puede adoptarse cualquiera de las secuencias de glucosilación mencionadas anteriormente y, como X, puede utilizarse cualquier aminoácido excepto prolina; sin embargo, debe seleccionarse una secuencia de glucosilación y un aminoácido que se espera que tengan poco impacto cuando se introducen como una mutación. Por ejemplo, en el caso de una sustitución de aminoácidos, es deseable una sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución de aminoácidos conservativa se refiere a una sustitución que tiene lugar entre los aminoácidos que tienen propiedades eléctricas, propiedades estructurales, polaridad o hidrofobicidad similares, etc., y se espera que la sustitución entre estos aminoácidos similares no altere

el fenotipo de la proteína. Los ejemplos incluyen un aminoácido básico (Lys, Arg e His), un aminoácido ácido (Glu y Asp), un aminoácido aromático (Trp, Phe, Tyr e His), un aminoácido ramificado (Val, Ile y Thr), un aminoácido polar (Ser, Thr, Tyr, Cys, Met, Gln, Asn y Gly) y un aminoácido hidrófobo (Ala, Val, Leu e Ile).

5 En una realización, utilizando la técnica mencionada anteriormente, el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de la β -glucosidasa derivada de *Pyrococcus furiosus* puede especificarse como H60-L61-Y62 (figura 1).

10 Además, según la presente invención, utilizando la secuencia de aminoácidos de la glucosidasa derivada de un termófilo en la que el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación se determina en la técnica mencionada anteriormente, el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación puede determinarse también en otra glucosidasa derivada de un termófilo que tiene la secuencia de aminoácidos que es altamente idéntica a la secuencia de aminoácidos anterior. Por ejemplo, después de determinar el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en la β -glucosidasa derivada de *Pyrococcus furiosus* mostrada en SEQ ID NO: 4 mediante la técnica
15 mencionada anteriormente, se realiza un análisis de alineamiento con respecto a otra enzima que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene alta identidad con la β -glucosidasa mostrada en la SEQ ID NO: 4, y la posición en la secuencia de aminoácidos de esta enzima que corresponde al sitio de introducción determinado en SEQ ID NO: 4 (por ejemplo, H60-L61-Y62) puede determinarse como el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación. Los ejemplos de otra enzima que tiene la secuencia de aminoácidos que tiene alta identidad con la β -glucosidasa mostrada en la SEQ ID NO: 4 incluyen las enzimas que tienen las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID
20 NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20.

25 En una realización, utilizando la técnica mencionada anteriormente, el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en las secuencias de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20 puede especificarse como N60-L61-N62, D60-L61-Y62, G61-N62-Y63, G61-N62-Y63, D58-L59-Y60, N63-N64-Y65 y K63-Q64-Y65, respectivamente (figura 2-1 y figura 2-2).

30 En una realización, la glucosidasa mutante, según la presente invención, comprende, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6. Preferentemente, la glucosidasa mutante, según la presente invención, consta de, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6.

35 En la presente invención, la actividad glucosidasa se refiere a la actividad de degradación de celobiosa. Es decir, es una actividad de catalizar la reacción para producir glucosa mediante hidrólisis de celobiosa, cuando se utiliza como un sustrato. La glucosidasa mutante de la presente invención conserva, preferentemente, el 40% o más, más preferentemente, el 50% o más, aún más preferentemente, el 60% o más y, de forma particularmente preferente, el 70% o más actividad con respecto a la actividad de degradación de celobiosa de la glucosidasa de tipo silvestre. La actividad de degradación de celobiosa de la glucosidasa mutante de la presente invención con respecto al tipo silvestre puede evaluarse, por ejemplo, añadiendo la glucosidasa mutante o la glucosidasa de tipo silvestre a una
40 solución tampón de celobiosa 10 mM / acetato 50 mM, llevando a cabo la reacción enzimática a 50°C, y a continuación midiendo la cantidad de glucosa producida. En este caso, la cantidad de glucosa producida puede cuantificarse de acuerdo con una técnica conocida públicamente, tal como el procedimiento enzimático y HPLC.

45 La glucosidasa mutante, según la presente invención, puede ser una obtenida mediante cualquier procedimiento; sin embargo, para que la secuencia de glucosilación introducida se glucosile selectivamente, la glucosidasa mutante se proporciona deseablemente cultivando una célula eucariota que contiene ADN que codifica la glucosidasa mutante.

Puede producirse ADN que codifica la glucosidasa mutante mediante el siguiente procedimiento. Es decir, puede producirse determinando el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en la secuencia de aminoácidos de una glucosidasa derivada de un termófilo mediante la técnica mencionada anteriormente, y a continuación introduciendo ADN que codifica la secuencia de glucosilación en la parte de la secuencia de nucleótidos en ADN que
50 codifica la glucosidasa que corresponde al sitio de introducción. En este caso, el término "ADN" abarca cualquier ácido nucleico que codifica la glucosidasa o la secuencia de glucosilación, que puede ser ADNc, ADN genómico, un gen y similares.

55 Los ejemplos de ADN que codifica una glucosidasa derivada de un termófilo incluyen ADN que codifica la glucosidasa derivada de un termófilo mencionada anteriormente, por ejemplo, ADN que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19, preferentemente, ADN que consta de las secuencias de nucleótidos anteriores. Además, ADN que codifica una glucosidasa derivada de un termófilo abarca
60 ADN que comprende una secuencia de nucleótidos capaz de hibridar con ADN que consta de una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 en condiciones rigurosas, preferentemente ADN que consta de la secuencia de nucleótidos anterior, y que codifica una proteína que tiene la actividad β -glucosidasa. La condición rigurosa puede ser una condición poco rigurosa, una condición medianamente rigurosa o una condición muy rigurosa. La condición rigurosa incluye, por ejemplo, llevar a
65 cabo hibridación en de 2 a 5 x SSC y SDS al 0,2% (en la que, 1 x SSC indica cloruro sódico 150 mM, citrato sódico

15 mM, y pH 7,0) a de 45 a 70°C, seguido por lavado con de 0,1 a 1 x SSC y SDS del 0,1 al 0,2% a de 45 a 65°C. La condición rigurosa se describe, por ejemplo, en el documento Sambrook y otros, Molecular Cloning, A Laboratory Manual ("Manual de laboratorio"), 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Además, ADN que codifica una glucosidasa derivada de un termófilo abarca ADN que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 que ha sido sometida a una o múltiple, sustitución, adición o inserción, o delección, sustitución, adición o inserción de uno o una pluralidad de nucleótidos y que codifica una proteína que tiene la actividad β -glucosidasa. En este caso, el alcance de "uno o una pluralidad" no está particularmente limitado; sin embargo, es preferentemente 10 o menos, más preferentemente cinco o menos, de forma particularmente preferente cuatro o menos, o uno o dos. Además, ADN que codifica una glucosidasa derivada de un termófilo abarca ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene el 85% o más, más preferentemente, el 90% o más y, de la forma más preferente, el 95% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19 según el cálculo utilizando BLAST y similares (por ejemplo, parámetro o parámetros por defecto, es decir, el parámetro o parámetros establecidos inicialmente), preferentemente ADN que consta de la secuencia de nucleótidos anterior, y que codifica una proteína que tiene la actividad β -glucosidasa.

Los ejemplos de ADN que codifica la secuencia de glucosilación incluyen ADN que codifica la secuencia de glucosilación mencionada anteriormente, y puede determinarse apropiadamente en consideración de los organismos huéspedes y la degeneración del código genético.

Puede producirse ADN que codifica la secuencia de glucosilación en ADN que codifica una glucosidasa mediante una técnica conocida públicamente tal como mutagénesis dirigida al sitio e introducción de una mutación específica por PCR (Sambrook y otros, descrito anteriormente).

En una realización, los ejemplos de ADN que codifica la glucosidasa mutante incluyen ADN que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 5. Preferentemente, los ejemplos de ADN que codifica la glucosidasa mutante incluyen ADN que consta de la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 5. En SEQ ID NO: 5, se introduce ADN que codifica la secuencia de glucosilación como -aacgcact- en las posiciones 178 a 186.

Además, puede añadirse ADN que codifica una secuencia señal de secreción que es adecuada para el huésped a ADN que codifica la glucosidasa mutante mencionada anteriormente. La secuencia señal de secreción puede añadirse apropiadamente al extremo 5' o extremo 3' de ADN que codifica la glucosidasa mutante y, preferentemente, se añade al extremo 5'. También puede incorporarse ADN que codifica la secuencia señal de secreción en un vector de expresión por adelantado. Por ejemplo, cuando el huésped es levadura, se utilizan la secuencia señal de factor α , la secuencia señal de α -amilasa, la secuencia señal de glucoamilasa, la secuencia señal de albúmina del suero, la secuencia señal derivada de inulina, la secuencia señal de invertasa, la secuencia señal de proteína citotóxica, la secuencia señal de lisozima, y similares. Particularmente en *Pichia pastoris*, la secuencia señal de secreción de factor α es preferente. La secuencia señal de secreción de factor α es conocida públicamente y, por ejemplo, está registrada en el GenBank con NP_015137, que puede utilizarse en la presente invención.

Cuando el género *Trichoderma* se utiliza como huésped, puede utilizarse la secuencia señal relacionada con celulasa. El género *Trichoderma* tiene una característica de secretar, como celulasa, celobiohidrolasa, xilanas, endoglucanasa, xilosidasa y xiloglucanasa fuera de la célula, y estas enzimas tienen, cada una, una secuencia señal de secreción: estas secuencias señal son conocidas públicamente, y pueden utilizarse secuencias peptídicas que contienen estas secuencias señal uniéndolas funcionalmente a la glucosidasa mutante.

ADN que codifica la glucosidasa mutante que tiene una o más secuencias de glucosilación que pueden someterse a glucosilación por una célula eucariota preparada como anteriormente está unido cadena abajo del promotor en un vector de expresión apropiado utilizando una enzima de restricción y una ADN ligasa, con lo que puede producirse un vector de expresión que porta el ADN.

Los ejemplos del vector de expresión incluyen un plásmido bacteriano, un plásmido de levadura, ADN de un fago (tal como el fago lambda), ADN de un virus tal como un retrovirus, un baculovirus, un virus vaccinia y un adenovirus, un derivado de SV40, y una agrobacteria como un vector para una célula vegetal, y cualquier otro vector puede utilizarse siempre que sea replicable y viable, y la glucosilación sea factible en la célula huésped. Los ejemplos del vector de expresión incluyen, cuando el huésped es levadura, pPink-HC, pPink-LC, pPink α -HC, pPCIZ, pPCIZ α , pPCI6, pPCI6 α , pFLD1, pFLD1 α , pGAPZ, pGAPZ α , pPIC9K y pPIC9.

Como promotor, puede utilizarse cualquier promotor siempre que sea un promotor adecuado que corresponda al huésped a utilizar para expresión génica, y puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Los ejemplos del promotor incluyen, cuando el huésped es levadura, el promotor AOX1, el promotor TEF1, el promotor ADE2, el promotor CYC1, el promotor GALL1, el promotor AOX2, el promotor YPT1, el promotor GAP y el promotor FLD.

La célula huésped que se utilizará en la presente invención puede ser cualquier célula huésped siempre que tenga el mecanismo de glucosilación. Los ejemplos preferentes de la célula huésped incluyen una célula de levadura, una

célula de hongo, una célula de insecto, una célula vegetal y una célula animal. Los ejemplos de la célula de levadura incluyen el género *Pichia*, el género *Saccharomyces* y el género *Schizosaccharomyces*. Los ejemplos de la célula de hongo incluyen el género *Aspergillus* y el género *Trichoderma*. Los ejemplos de la célula de insecto incluyen Sf9. Los ejemplos de la célula vegetal incluyen los dicotiledones. Los ejemplos de la célula animal incluyen CHO, HeLa, y HEK293. Más preferentemente, la célula huésped en una célula de levadura y, aún más preferentemente, es *Pichia pastoris*.

La transformación o transfección puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido públicamente, tal como el procedimiento de fosfato cálcico y electroporación. La glucosidasa mutante puede obtenerse expresándola en la célula huésped que ha sido transformada o transfectada, tal como se ha descrito anteriormente, bajo el control del promotor, y a continuación recogiendo el producto de expresión. Para expresión de la glucosidasa mutante, se permite a la célula huésped proliferar o crecer a una densidad celular apropiada, y el promotor es inducido por un desplazamiento de temperatura o medio de inducción química tal como la adición de isopropil-1-tio- β -D-galactósido (IPTG), y a continuación la célula se cultiva además durante cierto periodo de tiempo.

Cuando la glucosidasa mutante es excretada fuera de la célula, se purifica directamente del medio. Cuando la glucosidasa mutante está presente fuera de la célula, la célula es destruida mediante medios físicos tales como desintegración ultrasónica y desintegración mecánica o mediante medios químicos tales como un agente de lisis celular, y a continuación la glucosidasa mutante se purifica. La glucosidasa mutante puede purificarse parcial o totalmente del medio de la célula recombinante mediante una combinación de técnicas tal como precipitación con sulfato de amonio o precipitación con etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de alto rendimiento de fase inversa, cromatografía por afinidad, cromatografía por filtración en gel y electroforesis.

En la hidrólisis de biomasa celulósica, la glucosidasa mutante glucosilada de la presente invención tiene resistencia térmica superior y puede conseguir una eficiencia de degradación de celulosa que es 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces y dos o más veces tan elevada como la eficiencia de degradación de celulosa conseguida cuando una glucosidasa derivada de un termófilo se utiliza con una mezcla de celulosa no glucosilada. La glucosidasa mutante de la presente invención puede aplicarse a biomasa celulósica tal como biomasa celulósica que contiene un componente de lignina, Avicel que casi no contiene ningún componente de lignina, Solka Floc, y pasta industrial, y puede conseguir eficiencia de degradación de celulosa profunda particularmente en biomasa celulósica que contiene un componente de lignina.

La glucosidasa mutante obtenida como anteriormente puede utilizarse como una composición enzimática para sacarificación de biomasa mezclando con celulosa. La "celulosa", tal como se utiliza en el presente documento, no está particularmente limitada siempre que sea una enzima que tenga una actividad de degradación de celulosa, y puede ser una mezcla de uno o más tipos de celulosas. Los ejemplos de dicha enzima incluyen celulasa, hemicelulasa, celobiohidrolasa, endoglucanasa, exoglucanasa, xilanasas y mananasa.

La celulasa utilizada en la presente invención es, preferentemente, una mezcla de celulosas derivadas de hongos filamentosos. La mezcla de celulosas derivadas de hongos filamentosos es una mezcla que contiene, como mínimo, tanto endoglucanasa como celobiohidrolasa. Para llevar a cabo sacarificación de celulosa más eficiente, es preferente una mezcla de celulosas derivadas de hongos filamentosos que contiene dos o más tipos de endoglucanasas y/o dos o más tipos de celobiohidrolasas. Los ejemplos del microorganismo que produce la mezcla mencionada anteriormente de celulosas derivadas de hongos filamentosos incluyen el género *Trichoderma*, el género *Aspergillus*, el género *Cellulomonas*, el género *Clostridium*, el género *Streptomyces*, el género *Humicola*, el género *Acremonium*, el género *Irpex*, el género *Mucor* y el género *Talaromyces*. Dado que estos microorganismos producen una celulasa en el medio de cultivo líquido, el medio de cultivo líquido puede utilizarse directamente como una mezcla sin purificar de celulosas derivadas de hongos filamentosos, o una preparación obtenida de un producto purificado del medio de cultivo líquido puede utilizarse como la mezcla de celulosas derivadas de hongos filamentosos. La mezcla de celulosas derivadas de hongos filamentosos puede contener simultáneamente una β -glucosidasa producida por el microorganismo; sin embargo, considerando que no existe en una cantidad adecuada para la degradación de celulosa y, además, es claramente distinguible de la β -glucosidasa derivada del género *Pyrococcus* tal como se describirá más adelante, la β -glucosidasa, producida por el microorganismo que produce celulosa también está abarcada por celulasa en la presente invención. Cuando se utiliza una preparación obtenida de un producto purificado del medio de cultivo líquido mencionado anteriormente, puede añadirse una sustancia diferente de una enzima tal como un inhibidor de proteasa, un dispersante, un agente solubilizante y un estabilizante y el producto resultante puede utilizarse como una preparación de celulasa.

La mezcla de celulosas derivadas de hongos filamentosos utilizada en la presente invención es, preferentemente, una mezcla de celulosas producidas por el género *Trichoderma*. El género *Trichoderma* produce una mezcla de celulosas que contiene, como mínimo, dos tipos de endoglucanasas y, como mínimo, dos tipos de celobiohidrolasas en el medio de cultivo líquido, y una mezcla de celulosas preparadas a partir de dicho medio de cultivo líquido se utiliza preferentemente en la presente invención. Entre los organismos que pertenecen al género *Trichoderma*, una mezcla de celulosas derivadas de *Trichoderma reesei* es más preferente. Los ejemplos de la mezcla de celulosas derivadas de *Trichoderma reesei* incluyen una mezcla de celulosas derivadas de *Trichoderma reesei* QM9414,

Trichoderma reesei QM9123, *Trichoderma reesei* RutC-30, *Trichoderma reesei* PC3-7, *Trichoderma reesei* ATCC66589, *Trichoderma reesei* CL-847, *Trichoderma reesei* MCG77, *Trichoderma reesei* MCG80 y *Trichoderma viride* QM9123. Además, también puede utilizarse una cepa mutante derivada del género *Trichoderma* mencionado anteriormente que ha conseguido productividad de celulosa mejorada a través de tratamiento mutagénico utilizando un mutágeno, irradiación con rayos ultravioleta, o similares.

La mezcla de celulasas derivadas del género *Trichoderma* utilizada en la presente invención es una composición enzimática que contiene una pluralidad de componentes enzimáticos tales como celobiohidrolasa, endoglucanasa, exoglucanasa, β -glucosidasa, xilanasa y xilosidasa. La mezcla de celulasas derivadas del género *Trichoderma* puede llevar a cabo hidrólisis eficaz de celulosa debido al efecto concertado o el efecto complementario de una pluralidad de componentes enzimáticos en la hidrólisis de celulosa.

Celobiohidrolasa es un término genérico para celulasa que se caracteriza por comenzar la hidrólisis a partir de la sección terminal de celulosa, y un grupo de enzimas que pertenecen a celobiohidrolasa se enumera en EC No: EC3.2.1.91.

Endoglucanasa es un término genérico para celulasa que se caracteriza por comenzar la hidrólisis a partir de la parte media de la cadena molecular de celulosa, y un grupo de enzimas que pertenecen a endoglucanasa se enumera en EC NO: EC3.2.1.4, EC3.2.1.6, EC3.2.1.39 y EC3.2.1.73.

Exoglucanasa es un término genérico para celulasa que se caracteriza por comenzar la hidrólisis a partir del extremo de la cadena molecular de celulosa, y un grupo de enzimas que pertenecen a exoglucanasa se enumera en EC NO: EC3.2.1.74 y EC3.2.1.58.

β -glucosidasa es un término genérico para celulasa que se caracteriza por actuar sobre celooligosacáridos o celobiosa, y un grupo de enzimas que pertenecen a β -glucosidasa se enumera en EC No: EC3.2.1.21.

Xilanasa es un término genérico para celulasa que se caracteriza por actuar sobre hemicelulosa o, particularmente, xilano, y un grupo de enzimas que pertenecen a xilanasa se enumera en EC No: EC3.2.1.8.

Xilosidasa es un término genérico para celulasa que se caracteriza por actuar sobre xilooligosacáridos, y un grupo de enzimas que pertenecen a xilosidasa se enumera en EC No: EC3.2.1.37.

En la presente invención, se utiliza biomasa que contiene celulosa como sustrato de la reacción enzimática. La biomasa que contiene celulosa es celulosa que se deriva ampliamente de biomasa vegetal. Más específicamente, la biomasa que contiene celulosa es bagazo, forraje de maíz, mazorca de maíz, pasto de aguja, paja de arroz, paja de trigo, árboles, materiales leñosos, residuos de material de construcción, periódicos, papel usado, pasta y similares. Aunque la biomasa que contiene celulosa anterior contiene una impureza tal como el compuesto aromático macromolecular lignina y hemicelulosa, biomasa que contiene celulosa en la que lignina y hemicelulosa están parcialmente degradadas utilizando un ácido, un álcali, agua caliente presurizada, y similares como pretratamiento también puede utilizarse como celulosa. En este caso, biomasa que contiene celulosa pretratada tal como se ha descrito anteriormente se proporciona como "lignocelulosa", que puede utilizarse como un sustrato de la reacción enzimática.

Como biomasa que contiene celulosa utilizada en la presente invención, puede utilizarse una que ha sido sometida a pretratamiento tal como tratamiento con amoníaco, tratamiento con ácido sulfúrico diluido, y tratamiento hidrotérmico mediante una técnica conocida públicamente.

Para tratamiento con amoníaco, pueden aplicarse los procedimientos descritos en la publicación de patente japonesa (Kokai) No. 2008-161125 A y la publicación de patente japonesa (Kokai) No. 2008-535664 A. Específicamente, a la biomasa, se le añade amoníaco a una concentración del 0,1 al 15% en peso, y el tratamiento se lleva a cabo a de 4 a 200°C, preferentemente a de 90 a 150°C. El amoníaco a añadir puede estar en estado líquido o en estado gaseoso. Cuando el amoníaco está en estado líquido, puede utilizarse amoníaco líquido o una solución acuosa de amoníaco. El número de tratamientos no está particularmente limitado, y puede realizarse, como mínimo, una vez. Cuando el tratamiento se realiza dos veces o más, el primer tratamiento y el segundo tratamiento pueden realizarse en diferentes condiciones. El producto obtenido mediante el tratamiento con amoníaco necesita ser sometido a neutralización de amoníaco o eliminación de amoníaco antes de realizar la reacción de hidrólisis. La neutralización puede realizarse en un líquido que sigue conteniendo un contenido sólido o una fracción líquida a partir de la cual se ha separado el contenido sólido. Un reactivo ácido utilizado para neutralización no está particularmente limitado. El amoníaco también puede eliminarse mediante volatilización en estado gaseoso manteniendo el producto tratado con amoníaco en la condición de presión reducida. En ese caso, el amoníaco que ha sido eliminado puede recuperarse y reciclarse.

El tratamiento hidrotérmico puede realizarse, por ejemplo, añadiendo agua de modo que la biomasa que contiene celulosa sea del 0,1 al 50% en peso, y tratando la solución resultante a una temperatura de 100 a 400°C durante de un segundo a 60 minutos. El número de tratamientos no está particularmente limitado, y puede realizarse, como

mínimo, una vez. Cuando el tratamiento se realiza dos veces o más, el primer tratamiento y el segundo tratamiento pueden realizarse en diferentes condiciones.

Para tratamiento con ácido sulfúrico diluido, por ejemplo, la concentración de ácido sulfúrico es, preferentemente, del 0,1 al 15% en peso, más preferentemente, del 0,5 al 5% en peso. La temperatura de reacción puede establecerse en un intervalo de 100 a 300°C, preferentemente, a de 120 a 250°C. El tiempo de reacción puede establecerse en un intervalo de un segundo a 60 minutos. El número de tratamientos no está particularmente limitado, y puede realizarse, como mínimo, una vez. Cuando el tratamiento se realiza dos veces o más, el primer tratamiento y el segundo tratamiento pueden realizarse en diferentes condiciones. Dado que el hidrolizado obtenido mediante el tratamiento con ácido sulfúrico diluido contiene un ácido, es necesario neutralizado antes de utilizarlo en la reacción de hidrólisis.

Respecto a la condición del tratamiento enzimático de biomasa que contiene celulosa en la presente invención, cuando se utiliza una composición enzimática para sacarificación de biomasa que contiene una celulosa derivada de hongos filamentosos y la glucosidasa mutante de la presente invención, el tratamiento se lleva a cabo preferentemente a una temperatura de 40°C a 60°C, pH de 3 a 7, y una concentración de contenido sólido de biomasa que contiene celulosa del 0,1 al 30%. Estableciendo la condición del tratamiento enzimático en el intervalo anterior, la eficiencia de degradación de celulosa de una celulosa derivada de hongos filamentosos y una glucosidasa derivada de un termófilo puede maximizarse. Parte de la glucosidasa derivada de un termófilo tiene de forma natural una temperatura de reacción óptima de cerca de 100°C; sin embargo, la glucosidasa derivada de un termófilo utilizada en la presente invención muestra una actividad específica suficientemente alta incluso a de 40°C a 60°C y puede degradar de forma eficiente biomasa que contiene celulosa en presencia conjunta de una celulosa derivada de hongos filamentosos. Este tratamiento enzimático puede llevarse a cabo por lotes o de manera continua.

Debido a una elevada actividad β -glucosidasa de la composición enzimática para sacarificación de biomasa que contiene la glucosidasa mutante de la presente invención, un líquido que contiene azúcar obtenido mediante hidrólisis de biomasa celulósica utilizando esta composición enzimática tiene características de tener un pequeño contenido de celobiosa pero una gran cantidad de glucosa. Por consiguiente, un líquido que contiene azúcar obtenido utilizando la composición enzimática para sacarificación de biomasa, según la presente invención, puede utilizarse de forma favorable como fuente de carbono para el crecimiento de microorganismos o células cultivadas o para producción fermentativa utilizando estos microorganismos o células cultivadas. Los ejemplos del microorganismo o la célula cultivada utilizada en este caso incluyen levadura tal como levadura de panadería utilizada en la industria de la fermentación, bacterias tales como *E. coli* y el grupo corineforme de bacterias, hongos filamentosos, actinomicetos, células animales y células de insecto. Los microorganismos y las células que se utilizarán pueden ser las aisladas a partir de entornos naturales o aquellas que tienen propiedades parcialmente modificadas mediante mutación y recombinación genética. Además, dado que un líquido que contiene azúcar derivado de biomasa que contiene celulosa contiene pentosa tal como xilosa, un microorganismo que tiene una ruta del metabolismo de pentosa mejorada se utiliza preferentemente. Además, utilizando dicho líquido que contiene azúcar como la materia prima de fermentación, puede producirse un producto químico. Los ejemplos específicos del producto químico incluyen una sustancia que es producida en masa en la industria de la fermentación tal como un alcohol, un ácido orgánico, un aminoácido y un ácido nucleico, por ejemplo, un alcohol tal como etanol, 1,3-propanodiol, 1,4-butanodiol y glicerol, un ácido orgánico tal como ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico, ácido itacónico y ácido cítrico, un nucleósido tal como inosina y guanosina, un nucleótido tal como ácido inosínico y ácido guanílico, y un compuesto de amina tal como cadaverina. Además, el líquido que contiene azúcar también puede aplicarse a la producción de una enzima, un antibiótico, una proteína recombinante, y así sucesivamente.

El líquido que contiene azúcar obtenido mediante la hidrólisis de biomasa celulósica utilizando la composición enzimática para sacarificación de biomasa, según la presente invención, puede utilizarse como un líquido que contiene azúcar después de eliminar los residuos sólidos no degradados según sea necesario, o utilizarse directamente como líquido que contiene azúcar con los residuos sólidos aún contenidos en su interior.

En el procedimiento para hidrolizar biomasa utilizando la composición enzimática para sacarificación de biomasa, según la presente invención, la composición enzimática usada puede separarse y recuperarse del líquido que contiene azúcar obtenido mediante el tratamiento enzimático de biomasa que contiene celulosa. Aunque el procedimiento de separación y recuperación no está particularmente limitado, en comparación con una glucosidasa no glucosilada convencional, la glucosidasa mutante de la presente invención tiene características de tener una capacidad de adsorción enormemente reducida para biomasa que contiene celulosa, particularmente para lignocelulosa y también para una membrana de ultrafiltración. Por lo tanto, para separación y recuperación de la composición enzimática utilizada, se usa, preferentemente, un procedimiento de someter al hidrolizado a separación sólido-líquido según sea necesario, filtrar el líquido que contiene azúcar obtenido de este modo a través de una membrana de ultrafiltración, y separar y recuperar la composición enzimática como un líquido no permeable.

Como técnica de separación sólido-líquido en el procedimiento para hidrolizar biomasa, según la presente invención, puede utilizarse el procedimiento de filtración o el procedimiento de centrifugado. Los ejemplos del dispositivo para

llevar a cabo la separación sólido-líquido incluyen, aunque sin limitarse a los mismos, un filtro de banda, un decantador de tornillo, una centrífuga continua, un filtro prensa y un rotofiltro.

En el procedimiento para hidrolizar biomasa, según la presente invención, como membrana de ultrafiltración utilizada para separación y recuperación de la composición enzimática, pueden utilizarse las hechas de poliétersulfona (PES), polisulfona (PS), poliacrilonitrilo (PAN), difluoruro de polivinilideno (PVDF), celulosa regenerada, celulosa, un éster de celulosa, polisulfona sulfonada, poliétersulfona sulfonada, poliolefina, alcohol polivinílico, polimetilmetacrilato, politetrafluoroetileno y similares. Entre ellos, desde el punto de vista de utilización a largo plazo, es preferente una membrana de ultrafiltración hecha de un polímero sintético diferente de celulosa. Generalmente, una membrana de ultrafiltración hecha de un polímero sintético tiene un problema de que una enzima (proteína) tiene elevada capacidad de adsorción para dicha membrana. Sin embargo, la composición enzimática separada y recuperada en la presente invención tiene capacidad de adsorción reducida debido al efecto de glucosilación y, por lo tanto, se utiliza preferentemente. Con respecto al límite de peso molecular de la membrana de ultrafiltración utilizada en la presente invención, puede utilizarse una membrana de ultrafiltración que tiene un límite de peso molecular de 500 Da a 100000 Da. Entre dichas membranas de ultrafiltración, particularmente, puede utilizarse de la forma más preferente una con un límite de peso molecular que varía entre 10000 Da y 30000 Da, que puede separar y recuperar tanto la glucosidasa mutante de la presente invención como el componente de celulasa derivado de hongos filamentosos con buen rendimiento.

El procedimiento de filtración utilizando una membrana de ultrafiltración incluye filtración normal y filtración tangencial, y desde el punto de vista de inhibición del ensuciamiento de la membrana, es preferente la filtración tangencial. Además, como la forma de la membrana de ultrafiltración a utilizar, puede usarse una membrana formada apropiadamente tal como una membrana de tipo plano, una membrana de tipo espiral, una membrana de tipo tubular y una membrana de tipo de hilo hueco. Los ejemplos específicos incluyen tipo G-5, tipo G-10, tipo G-20, tipo G-50, tipo PW y tipo HWS UF, todas las cuales son suministradas por DESAL, HFM-180, HFM-183, HFM-251, HFM-300, HFM-116, HFM-183, HFM-300, HFK-131, HFK-328, MPT-U20, MPS-U20P y MPS-U20S, todas las cuales son suministradas por Koch Membrane Systems Inc., SPE1, SPE3, SPE5, SPE10, SPE30, SPV5, SPV50 y SOW30, todas las cuales son suministradas por Synder Filtration, el producto de la serie microza(R) UF fabricado por Asahi Kasei Corporation correspondiente a un límite de peso molecular de 3000 a 100000, y NTR7410 y NTR7450 fabricados por Nitto Denko Corporation.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los ejemplos. Sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

[Ejemplo comparativo 1] Preparación de β -glucosidasa derivada de *Pyrococcus furiosus* (1)

Una β -glucosidasa derivada de la archaea hipertermófila *Pyrococcus furiosus* (en lo sucesivo en el presente documento, denominada como "PfuBGL") es tan resistente al calor que sigue siendo activa a 100°C o más, e hidroliza diversos tipos de celooligosacáridos para producir glucosa; por lo tanto, se tiene prevista PfuBGL para utilización eficaz de biomasa celulósica.

En cuanto al gen de PfuBGL, el gen mostrado en SEQ ID NO: 3 se sintetizó enteramente y se unió a NcoI y BamHI de pET-11d utilizando Ligation High (Toyobo Co., Ltd.), y el vector resultante se utilizó para transformación de JM109 (Takara Bio Inc.). Se realizó cribado utilizando un medio de agar LB que contenía ampicilina como antibiótico. A partir de la cepa JM109 transformada, el vector pET-PfuBGL preparado de este modo se aisló mediante el kit miniprep (QIAGEN) y se sometió a un análisis de la secuencia de nucleótidos. El pET-PfuBGL se utilizó para transformación de la cepa BL21(DE3)pLysS de *E. coli* de expresión, con lo que se preparó una cepa BL21-PfuBGL. La cepa BL21-PfuBGL se inoculó en 10 ml de un medio de agar LB que contenía ampicilina, seguido por cultivo con agitación (precultivo) a 37°C durante una noche. Como cultivo principal, las bacterias obtenidas mediante el precultivo se inocularon en 1 l de un medio de agar LB que contenía ampicilina, y se realizó cultivo con agitación hasta DO 600, la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, alcanzaba 0,8. Posteriormente, se añadió isopropil-1-tio- β -D-galactósido (IPTG), de modo que la concentración final era 0,4 mM, y el cultivo con agitación continuó adicionalmente a 25°C durante una noche. Después del cultivo, las bacterias se recogieron mediante centrifugado y se resuspendieron en un tampón tris-HCl 50 mM (pH 8,0). La solución resultante se sometió a disgregación ultrasónica mientras se enfriaba con hielo, y el sobrenadante se recogió mediante centrifugado como un extracto libre de células. El extracto libre de células obtenido de este modo se mantuvo caliente a 85°C durante 15 minutos, y tuvo lugar la sedimentación por coagulación de proteínas derivadas de *E. coli* diferentes de la glucosidasa. El sedimento se eliminó mediante centrifugado y el sobrenadante se dializó contra un tampón acetato 50 mM (pH 5,0) a través de una membrana de diálisis hecha de celulosa regenerada con un límite de peso molecular de 10000 (fabricada por Spectrum Laboratories, Inc.). La solución de proteínas obtenida de este modo se utilizó como PfuBGL de tipo silvestre.

[Ejemplo 1] Determinación del sitio de introducción de la secuencia de glucosilación unida a N en PfuBGL

En primer lugar, la determinación de la secuencia primaria y la estructura terciaria se intentó para buscar el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en PfuBGL.

Para realizar alineamiento con respecto a un homólogo de PfuBGL, se utilizó el servidor de búsqueda de homólogos FUGUE. Como resultado, en términos de puntuación z (ZSCORE), que indica la homología de la secuencia, PfuBGL mostraba una puntuación máxima de 71,65 con respecto a la familia de glucosil hidrolasa 1 (puntuación $z \geq 6,0$ indica el 99% de confianza). Para formar el alineamiento de la familia de glucosil hidrolasa 1 obtenida de este modo, se utilizó el servidor JOY. Como resultado, se descubrió que la secuencia de PfuBGL correspondiente a la posición de la secuencia de glucosilación unida a N que está presente en tres sitios en la β -glucosidasa derivada de *Aspergillus niger* (AspNgBGL) y en la β -glucosidasa derivada de *Trichoderma reesei* (TriReBGL) no era la secuencia de glucosilación unida a N (tres sitios: H60, L61 y Y62, N148, L149 y Y150, y N374, G375 y M376).

Se notifica una estructura cristalina de PfuBGL en rayos X incompleta (Thijis K. y otros, Biochem. vol. 39, No. 17 (2000)), que tiene capacidad de degradación de tan solo 3,3 Å. Aún no ha sido construido un modelo estructural completo, y dicho modelo aún no ha sido registrado en el banco Protein Data Bank (PDB). A la luz de lo anterior, para determinar la estructura terciaria de PfuBGL, se intentó cristalografía por rayos X detallada utilizando nuevas condiciones de cristalización. Se buscaron nuevas condiciones de cristalización y la cristalización se consiguió con éxito utilizando ácido fosfórico como agente precipitante. Se realizó un experimento de difracción por rayos X en la gran instalación de radiación de sincrotrón SPring-8, y la estructura de PfuBGL se determinó con una capacidad de degradación de 2,5 Å, con lo que un modelo completo de PfuBGL se construyó con éxito. Para determinación estructural, se utilizó el procedimiento de sustitución molecular y, como molécula modelo, se utilizó la β -glucosidasa derivada de *Thermosphaera aggregans* mostrada en SEQ ID NO: 8 (ThAggBGY, PDB ID: 1 QVB).

A partir de la estructura terciaria de PfuBGL obtenida de este modo, en los tres sitios mencionados anteriormente correspondientes a la posición de la secuencia de glucosilación unida a N, un sitio que está expuesto a la superficie de la enzima y no está ubicado cerca del sitio activo, teniendo de este modo presumiblemente poco impacto sobre la actividad enzimática, se descubrió solamente en H60, L61 y Y62. Por consiguiente, este sitio se determinó como el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación unida a N, y una mutación de H60N, L61R y Y62T se introdujo mediante sustitución, con lo que la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 se obtuvo como el mutante de glucosilación PfuBGL.

[Ejemplo 2] Determinación del sitio de introducción de la secuencia de glucosilación unida a N en una glucosidasa que tiene una secuencia de aminoácidos homóloga a PfuBGL

Para realizar el alineamiento entre SEQ ID NO: 6 obtenida en el ejemplo 1 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, se formó un alineamiento utilizando ClustalW y BOXSHADE, ambos de los cuales son software que es bien conocido por los expertos en la materia (figura 2-1 y figura 2-2). En SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 20, un sitio correspondiente a la secuencia de glucosilación Asn-Arg-Thr (N-R-T) en SEQ ID NO: 6 se determinó como el sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en cada secuencia.

[Ejemplo 3] Preparación de la PfuBGL mutante glucosilada (1)

Se preparó la PfuBGL mutante glucosilada mostrada en SEQ ID NO: 6.

En primer lugar, utilizando los cebadores introductores de mutaciones 5'-CCACATATTGGCACCTCTATAAGCAAGATCATG-3' (SEQ ID NO: 21) y 5'-CATGATCTTGCTTAGTGCGTTCCAATATGCTGG-3' (SEQ ID NO: 22) para introducir la secuencia de glucosilación determinada en el ejemplo 1 en PfuBGL mostrada en SEQ ID NO: 4, se introdujo una mutación en la secuencia de glucosilación unida a N mediante mutagénesis dirigida al sitio. Después de confirmar la secuencia del gen obtenida de este modo, ésta se insertó entre los sitios de EcoRI y NotI en el vector de expresión de levadura pPIC9, que originalmente posee la secuencia señal de secreción de factor α . El gen con mutación introducida se utilizó para transformación de *E. coli*, y la colonia que tenía el gen que tenía la mutación deseada se confirmó mediante un secuenciador.

Células competentes de levadura producidas mediante una técnica general se mezclaron con los plásmidos mutantes, con lo que la transformación se realizó utilizando GENE PULSERII (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en las condiciones de 1,7 kV, 25 μ F y 200 Ω . La levadura transformada se sembró en estrías en una placa de RDB. Tres días después, a partir de las colonias que aparecieron en la placa, se seleccionaron 10 colonias y se comprobó la expresión. Se seleccionó un clon en el que la expresión de la proteína deseada se confirmó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Como cultivo de siembra, la colonia de levadura en la placa se inoculó en 2 ml de un medio BMGY y se cultivó durante dos días. Posteriormente, como cultivo principal, 2 ml del líquido de cultivo de siembra de levadura se añadieron a 1 l de un medio BMGY y se cultivaron durante dos días para permitir a la levadura proliferar

suficientemente. A continuación, 1 l del líquido de cultivo se sometió a centrifugado una vez para precipitar la levadura, y el medio BMGY se intercambió por un medio BMMY que contenía metanol al 2%. La levadura se resuspendió a continuación en el medio, seguida por cultivo durante 48 horas. El medio que contenía la proteína expresada se recogió por centrifugado y se filtró a través de un filtro, seguido por precipitación con sulfato de amonio utilizando sulfato de amonio al 70% (p/v). El precipitado se recogió por centrifugado y se disolvió en un tampón, y se realizó diálisis y se obtuvo la proteína deseada.

La enzima obtenida de este modo se trató con EndoH y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida (figura 3). La preparación de la PfuBGL mutante glucosilada unida a N se confirmó mediante un desplazamiento de banda antes y después del tratamiento con EndoH.

[Ejemplo 4] Actividad enzimática de la PfuBGL mutante glucosilada (2)

Se comparó la actividad β -glucosidasa de la PfuBGL mutante glucosilada y PfuBGL. Utilizando una solución tampón de celobiosa 10 mM / acetato 50 mM como sustrato, las enzimas preparadas en el ejemplo 2 y el ejemplo comparativo 1 se añadieron, cada una, a una concentración final de 0,23 mg/ml y la reacción enzimática se llevó a cabo a 50°C. Para la cuantificación del producto, se utilizó Glucose Test Wako II (Wako Pure Chemical Industries, Inc.).

Se calculó una unidad (U) de la actividad β -glucosidasa de acuerdo con la siguiente fórmula.

Una unidad (U) de la actividad β -glucosidasa = la concentración de glucosa producida una vez completada la reacción (g/l) x 1000 / 180 / 30

Además, se calculó una actividad β -glucosidasa específica para la cantidad de β -glucosidasa (mg) se calculó mediante la siguiente fórmula.

Actividad β -glucosidasa específica (U/mg proteína) = actividad β -glucosidasa (U) / la cantidad de β -glucosidasa añadida para la medición de la actividad

PfuBGL producía 1,58 g/l, mientras que la PfuBGL mutante glucosilada producía 1,34 g/l de glucosa una vez completada la reacción. Además, la actividad específica de la PfuBGL mutante glucosilada era del 85% con respecto a la actividad específica de PfuBGL, indicando claramente que la introducción de la mutación de la secuencia de glucosilación en el sitio determinado en el ejemplo 1 no causaba una pérdida de la actividad enzimática. A partir de esto, se confirmó que la PfuBGL mutante glucosilada es utilizable en lugar de PfuBGL.

[Ejemplo 5] Estabilidad térmica de la PfuBGL mutante glucosilada

Se midieron los cambios de la cantidad de glucosa producida hasta 24 horas cuando el producto se mantuvo caliente a 50°C, 60°C, 70°C, 80°C y 90°C.

Las enzimas preparadas en el ejemplo 2 y el ejemplo comparativo 1 (concentración de proteínas de 1,0 mg/ml) se mantuvieron, cada una, calientes a 50°C, 60°C, 70°C, 80°C o 90°C. En cada tiempo de retención de calor, se añadió un sustrato, que era una solución tampón de celobiosa 10 mM / acetato 50 mM, y la reacción enzimática se llevó a cabo durante 30 minutos a la temperatura de retención de calor. La solución después de la reacción se recogió y el producto se cuantificó utilizando Glucose Test Wako II (Wako Pure Chemical Industries, Inc.) (figura 4 y figura 5).

Calentando hasta 24 horas, en comparación con PfuBGL, la PfuBGL mutante glucosilada mostraba inactivación enzimática más reducida a una temperatura elevada. Este descubrimiento confirmó que la PfuBGL mutante glucosilada conseguía estabilidad enzimática mejorada adquiriendo una mayor resistencia al calor que PfuBGL.

[Ejemplo de referencia 1] Preparación de lignocelulosa

Las lignocelulosas 1 a 3 que se utilizarán para la hidrólisis utilizando una composición enzimática que contiene la glucosidasa mutante glucosilada se prepararon de la siguiente manera.

1. Preparación de lignocelulosa 1 (tratamiento con amoníaco)

Como celulosa, se utilizó paja de arroz. La celulosa anterior se colocó en un pequeño reactor (fabricado por Taiatsu Techno, TVS-N2 30 ml) y se enfrió con nitrógeno líquido. A este reactor, se le infundió amoníaco gaseoso y la muestra se sumergió completamente en amoníaco líquido. El reactor se tapó y se dejó a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos. Además, se trató en un baño de aceite de 150°C durante una hora. Después del tratamiento, el reactor se sacó del baño de aceite y el amoníaco gaseoso se dejó escapar inmediatamente en una campana extractora. Posteriormente, el interior del reactor se secó sometiéndolo al vacío a 10 Pa mediante una bomba de vacío. El producto resultante se utilizó en los siguientes ejemplos como lignocelulosa 1.

2. Preparación de lignocelulosa 2 (tratamiento con ácido sulfúrico diluido)

Como celulosa, se utilizó paja de arroz. La celulosa se sumergió en una solución acuosa al 1% de ácido sulfúrico, seguido por tratamiento en autoclave (fabricado por Nitto koatsu K.K.) a 150°C durante 30 minutos. Después del tratamiento, se realizó separación sólido-líquido para separar una solución acuosa de ácido sulfúrico (en lo sucesivo en el presente documento, líquido de tratamiento con ácido sulfúrico diluido) a partir de celulosa tratada con ácido sulfúrico. Posteriormente, celulosa tratada con ácido sulfúrico y el líquido de tratamiento con ácido sulfúrico diluido se mezclaron mediante agitación, de modo que la concentración de contenido sólido era el 10% en peso. Posteriormente, el pH se ajustó a aproximadamente 5 con hidróxido sódico. El producto resultante se utilizó en los siguientes ejemplos como lignocelulosa 2.

3. Preparación de lignocelulosa 3 (tratamiento hidrotérmico)

Como celulosa, se utilizó paja de arroz. La celulosa anterior se sumergió en agua y se sometió a tratamiento en autoclave (fabricado por Nitto koatsu K.K.) a 180°C durante 20 minutos mientras se agitaba. En este tratamiento, la presión era 10 MPa. Después del tratamiento, el producto resultante se sometió a separación sólido-líquido mediante centrifugado (3000G) para separar el componente de solución (en lo sucesivo en el presente documento, la solución de tratamiento hidrotérmico) del componente de biomasa tratada. El componente de biomasa tratada resultante se utilizó en los siguientes ejemplos como lignocelulosa 3.

[Ejemplo 6] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la PfuBGL mutante glucosilada (1)

Los cambios de la cantidad de glucosa producida permitiendo a la composición enzimática actuar sobre el sustrato de lignocelulosa se compararon. Un tampón de acetato 50 mM (pH 5,0) en el que se suspendió lignocelulosa al 5% en peso 1 (preparada en el ejemplo de referencia 1) se utilizó como sustrato. Se dejó proseguir a la reacción hasta 28 horas a 50°C, y el producto de reacción se muestreó según era apropiado y se midió para conocer la concentración de glucosa (figura 6). Como mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos, se utilizó celulosa disponible en el mercado derivada de *Trichoderma reesei* (Celluclast, Sigma). Como glucosidasas, se utilizaron, cada una, la PfuBGL mutante glucosilada preparada en el ejemplo 2 y PfuBGL preparada en el ejemplo comparativo 1. Se añadió celulosa a 0,5 mg/ml y se añadió glucosidasa a 0,005 mg/ml (1/100 de la cantidad de celulosa).

Comparando la utilización de PfuBGL y la utilización de la PfuBGL mutante glucosilada, la cantidad de glucosa producida por la PfuBGL mutante glucosilada después de 28 horas de reacción se incrementaba enormemente, y era 1,6 veces la cantidad producida por PfuBGL. Se reveló que la adición de la PfuBGL mutante glucosilada solamente en una cantidad de 1/100 la cantidad de celulosa era tremendamente eficaz para incrementar la cantidad de producción de glucosa.

[Ejemplo de referencia 2] Preparación de una celulasa derivada de *Trichoderma*

Una celulasa derivada de *Trichoderma* se preparó mediante el siguiente procedimiento.

1. Precultivo

Las siguientes sustancias se añadieron a agua destilada en las cantidades indicadas a continuación; licor de maceración de maíz al 5% (p/vol), glucosa al 2% (p/vol), tartrato de amonio al 0,37% (p/vol), sulfato de amonio al 0,14% (p/vol), dihidrogenofosfato potásico al 0,2% (p/vol), cloruro cálcico dihidratado al 0,03% (p/vol), sulfato de magnesio heptahidratado al 0,03% (p/vol), cloruro de cinc al 0,02% (p/vol), cloruro de hierro (III) hexahidratado al 0,01% (p/vol), sulfato de cobre (II) pentahidratado al 0,004% (p/vol), cloruro de manganeso tetrahidratado al 0,0008% (p/vol), ácido bórico al 0,0006% (p/vol), y hexamolibdato de hexaamonio tetrahidratado al 0,0026% (p/vol). A continuación, 100 ml de la solución resultante se vertieron en un matraz triangular de 500 ml con un deflector y se esterilizaron autoclavando a 121°C durante 15 minutos. Después de refrigerar de forma natural, PE-M y Tween 80, que se esterilizaron, cada uno, autoclavando a 121°C durante 15 minutos, se añadieron, cada uno, al 0,1%. Al medio de precultivo resultante, se le inoculó *Trichoderma reesei* ATCC66589 a 1×10^5 /ml, y se realizó el precultivo agitando a 28°C durante 72 horas a 180 rpm (agitador: BIO-SHAKER BR-40LF fabricado por Taitec Corporation).

2. Cultivo principal

Las siguientes sustancias se añadieron a agua destilada en las cantidades indicadas a continuación; licor de maceración de maíz al 5% (p/vol), glucosa al 2% (p/vol), celulosa (Avicel) al 10% (p/vol), tartrato de amonio al 0,37% (p/vol), sulfato de amonio al 0,14% (p/vol), dihidrogenofosfato potásico al 0,2% (p/vol), cloruro cálcico dihidratado al 0,03% (p/vol), sulfato de magnesio heptahidratado al 0,03% (p/vol), cloruro de cinc al 0,02% (p/vol), cloruro de hierro (III) hexahidratado al 0,01% (p/vol), sulfato de cobre (II) pentahidratado al 0,004% (p/vol), cloruro de manganeso tetrahidratado al 0,0008% (p/vol), ácido bórico al 0,0006% (p/vol) y hexamolibdato de hexaamonio tetrahidratado al

0,0026% (p/vol). A continuación, 2,5 l de la solución resultante se vertieron en un frasco de agitación de 5 l (DPC-2A fabricado por ABLE & Biott Co., Ltd.) y se esterilizaron autoclavando a 121°C durante 15 minutos. Después de refrigerar de forma natural, PE-M y Tween 80, que se esterilizaron, cada uno, autoclavando a 121°C durante 15 minutos, se añadieron, cada uno, al 0,1%. En esto, se inocularon 250 ml de *Trichoderma reesei* ATCC66589 que había sido precultivado en el medio de cultivo líquido mediante el procedimiento mencionado anteriormente. Seguidamente, los hongos se cultivaron a 28°C durante 87 horas a 300 rpm con una tasa de aireación de 1 vvm, seguida por centrifugado, y el sobrenadante se filtró a través de una membrana (STERICUP-GV, material: PVDF, fabricada por Millipore Corporation).

[Ejemplo 7] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la PfuBGL mutante glucosilada (2)

La hidrólisis de lignocelulosas 1 a 3 se realizó de la misma manera que en el ejemplo 6 excepto por utilizar lignocelulosas 1 a 3 preparadas en el ejemplo de referencia 1 como sustrato, el líquido de cultivo de *Trichoderma reesei* preparado en el ejemplo de referencia 2 como la mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos, y añadiendo celulasa a 1,0 mg/ml y glucosidasa a 0,005 mg/ml (1/100 de la cantidad de celulasa).

En la tabla 2, se compararon las concentraciones de glucosa (g/l) producidas después de 28 horas de reacción.

[Tabla 2]

Sustrato	Concentración de glucosa producida (g/l)	
	PfuBGL de tipo silvestre	PfuBGL mutante glucosilada
Lignocelulosa 1 (Tratamiento con amoníaco)	5 g/l	15 g/l
Lignocelulosa 2 (Tratamiento con ácido sulfúrico diluido)	3 g/l	16 g/l
Lignocelulosa 3 (Tratamiento hidrotérmico)	4 g/l	18 g/l

Comparando la utilización de PfuBGL y la utilización de la PfuBGL mutante glucosilada, la cantidad de glucosa producida por la PfuBGL mutante glucosilada después de 28 horas de reacción se incrementaba enormemente, y era 1,8 veces la cantidad producida por PfuBGL. Se reveló que la adición de la PfuBGL mutante glucosilada solamente en una cantidad de 1/200 la cantidad de celulasa producía un efecto de incrementar enormemente la cantidad de producción de glucosa. Se reveló que no solamente celulasa disponible en el mercado tal como la utilizada en el ejemplo 6 sino también el líquido de cultivo de *Trichoderma reesei* ejercían un efecto en utilización con un mutante glucosilado.

[Ejemplo 8] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la PfuBGL mutante glucosilada (3)

Utilizando la composición enzimática compuesta por una celulasa derivada de hongos filamentosos y la PfuBGL mutante glucosilada, las cantidades de glucosa producida se estudiaron comparativamente modificando las condiciones de temperatura de reacción de hidrólisis. Ajustando la temperatura de reacción a 30°C, 40°C, 50°C (ejemplo 7) o 60°C, la hidrólisis se realizó mediante un procedimiento similar al ejemplo 7, y se midió la cantidad de glucosa producida después de 28 horas. Como sustrato, se utilizó lignocelulosa 1.

[Tabla 3]

Temperatura de reacción de hidrólisis (°C)	Concentración de glucosa producida (g/l)
30°C	5 g/l
40°C	13 g/l
50°C (ejemplo 7)	15 g/l
60°C	7 g/l

Tal como se muestra en la tabla 3, se reveló que era preferible establecer la temperatura de reacción en un intervalo de 40°C a 50°C cuando se utilizaba una celulasa derivada de hongos filamentosos, particularmente una celulasa derivada de *Trichoderma*. Este resultado refleja el hecho de que la temperatura de reacción óptima para una celulasa derivada de *Trichoderma* es de 40°C a 50°C. Es decir, se reveló que, aunque la glucosidasa derivada de un termófilo, según la presente invención, seguía siendo muy activa a 50°C o más, cuando se utiliza como una composición enzimática para sacarificación de biomasa que contiene una celulasa derivada de hongos filamentosos,

la reacción se llevó a cabo, preferentemente, dentro de un intervalo de la temperatura de reacción óptima para la celulasa derivada de hongos filamentosos.

[Ejemplo 9] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la PfuBGL mutante glucosilada (4)

Utilizando la composición enzimática compuesta por una celulasa derivada de hongos filamentosos y la PfuBGL mutante glucosilada, las cantidades de glucosa producida se estudiaron comparativamente modificando las condiciones de pH de la reacción de hidrólisis. Ajustando el pH de la reacción de hidrólisis a 1,2, 3,5, 5,0 (ejemplo 7), 7,0 u 8,2 mediante la adición de ácido sulfúrico diluido, la hidrólisis se realizó mediante un procedimiento similar al ejemplo 7, y se midió la cantidad de glucosa producida después de 28 horas. Como sustrato, se utilizó lignocelulosa 1.

[Tabla 4]

pH de reacción de hidrólisis	Concentración de glucosa producida (g/l)
1,2	2 g/l
3,5	12 g/l
5 (Ejemplo 7)	15 g/l
7	10 g/l
8,2	5 g/l

Tal como se muestra en la tabla 4, se reveló que era preferible llevar a cabo la hidrólisis en un intervalo de pH 3,5 a pH 7 cuando se utiliza una celulasa derivada de hongos filamentosos, particularmente una celulasa derivada de *Trichoderma*.

[Ejemplo comparativo 2] Preparación de una glucosidasa homóloga a PfuBGL (2)

Se prepararon siete tipos de glucosidasas que tienen secuencias de aminoácidos homólogas a PfuBGL preparada en el ejemplo comparativo 1 de la siguiente manera.

Se sintetizaron secuencias de ADN de SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33 y 35, cada una, completamente y se incorporaron en el sitio de clonación de pET-11d (entre NcoI y BamHI), con lo que se construyó el vector de expresión para cada uno de los ADN anteriores. Posteriormente, de una manera similar al ejemplo comparativo 1, se obtuvieron las glucosidasas de tipo silvestre representadas por SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34 y 36 (ThAggBGY, CmGHFP, SaBGAL, SsoBGAL, PtBGAL, TvBGAL y FnGHFP).

[Ejemplo 10] Preparación de una glucosidasa mutante glucosilada homóloga a PfuBGL

En base a la información del sitio de introducción de la secuencia de glucosilación en PfuBGL determinada en el ejemplo 2, se determinó el sitio de introducción de la cadena de azúcares en las glucosidasas de tipo silvestre obtenidas en el ejemplo comparativo 2 (ThAggBGY, CmGHFP, SaBGAL, SsoBGAL, PtBGAL, TvBGAL y FnGHFP), con lo que se prepararon las glucosidasas mutantes glucosiladas, cada una.

Se sintetizaron secuencias de ADN de SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47 y 49 que codifican glucosidasa mutante glucosilada, cada una, completamente y se incorporaron entre EcoRI y NotI del vector pCU9, con lo que se construyó el vector de expresión para cada uno de los anteriores ADN. Posteriormente, de una manera similar al ejemplo 3, se obtuvieron glucosidasas mutantes glucosiladas representadas por las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 38, 40, 42, 44, 46, 48 y 50.

[Ejemplo 11] Actividad enzimática de la glucosidasa mutante glucosilada

La actividad enzimática de las glucosidasas mutantes glucosiladas obtenidas en el ejemplo 10 se midió de una manera similar al ejemplo 4 y se comparó con la actividad enzimática de cada glucosidasa de tipo silvestre obtenida en el ejemplo comparativo 2. Ajustando la actividad enzimática de cada glucosidasa de tipo silvestre a 100, la actividad enzimática del mutante glucosilado se mostró como actividad relativa (%) en la tabla 5.

[Tabla 5]

No de entrada	SEQ ID NO	Glucosidasa	Actividad relativa (%) de glucosidasa mutante glucosilada con respecto al tipo silvestre
1 (Ejemplo 4)	6	PfuBGL	85%
2	38	ThAggBGY	90%
3	40	CmGHFP	83%
4	42	SaBGAL	87%
5	44	SsoBGAL	81%
6	46	PtBGAL	85%
7	48	TvBGAL	93%
8	50	FnGHFP	78%

En la tabla 5, se descubrió que las glucosidasas mutantes glucosiladas conservan la actividad enzimática en comparación con la glucosidasa de tipo silvestre antes de la glucosilación.

[Ejemplo 12] Estabilidad térmica de la glucosidasa mutante glucosilada

De una manera similar al ejemplo 5, se llevó a cabo una prueba de estabilidad térmica en cada glucosidasa de tipo silvestre obtenida en el ejemplo comparativo 2 y en cada glucosidasa mutante glucosilada obtenida en el ejemplo 10. Respecto a la estabilidad térmica, ajustando la actividad enzimática antes de aplicar calor en 100, la actividad residual en cada tiempo de retención de calor se mostró como actividad relativa en las figuras 8 a 20. Se reveló que en todas las glucosidasas, las mutantes glucosiladas (figura 9, figura 11, figura 13, figura 15, figura 17, figura 19 y figura 21) mostraban estabilidad térmica mejorada en comparación con el tipo silvestre (figura 8, figura 10, figura 12, figura 14, figura 16, figura 18 y figura 20).

[Ejemplo 13] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la glucosidasa mutante glucosilada (5)

De una manera similar al ejemplo 6, utilizando cada glucosidasa de tipo silvestre obtenida en el ejemplo comparativo 2 y cada glucosidasa mutante glucosilada obtenida en el ejemplo 10, se llevó a cabo la hidrólisis de lignocelulosa 1 (tratamiento con amoníaco) preparada en el ejemplo de referencia 1. La cantidad de glucosa producida por cada glucosidasa después de 28 horas de reacción (g/l) se mostró en la tabla 6.

[Tabla 6]

No de entrada	Glucosidasa	Concentración de glucosa producida (g/l)	
		Glucosidasa de tipo silvestre (ejemplo comparativo 2)	Glucosidasa mutante glucosilada (ejemplo 10)
2	ThAggBGY	5 g/l	10 g/l
3	CmGHFP	4 g/l	9 g/l
4	SaBGAL	5 g/l	11 g/l
5	SsoBGAL	6 g/l	12 g/l
6	PtBGAL	5 g/l	9 g/l
7	TvBGAL	4 g/l	10 g/l
8	FnGHFP	6 g/l	13 g/l

Tal como se muestra en la tabla 6, en la hidrólisis de lignocelulosa 1 tratada con amoníaco, la producción de azúcar por las glucosidasas mutantes glucosiladas por unidad de tiempo se incrementó enormemente en comparación con el tipo silvestre, confirmando que las glucosidasas mutantes glucosiladas presentaban excelente eficiencia de degradación de celulosa.

[Ejemplo 14] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la glucosidasa mutante glucosilada (6)

De una manera similar al ejemplo 6, utilizando cada glucosidasa de tipo silvestre obtenida en el ejemplo comparativo 2 y cada glucosidasa mutante glucosilada obtenida en el ejemplo 10, se llevó a cabo la hidrólisis de lignocelulosa 2

(tratamiento con ácido sulfúrico diluido) preparada en el ejemplo de referencia 1. La cantidad de glucosa producida por cada glucosidasa después de 28 horas de reacción (g/l) se mostró en la tabla 7.

[Tabla 7]

No de entrada	Glucosidasa	Concentración de glucosa producida (g/l)	
		Glucosidasa de tipo silvestre (ejemplo comparativo 2)	Glucosidasa mutante glucosilada (ejemplo 10)
2	ThAggBGY	5 g/l	10 g/l
3	CmGHFP	4 g/l	9 g/l
4	SaBGAL	5 g/l	11 g/l
5	SsoBGAL	6 g/l	12 g/l
6	PtBGAL	5 g/l	9 g/l
7	TvBGAL	4 g/l	10 g/l
8	FnGHFP	6 g/l	13 g/l

Tal como se muestra en la tabla 7, en la hidrólisis de lignocelulosa 2 tratada con ácido sulfúrico diluido, la producción de azúcar por las glucosidasas mutantes glucosiladas por unidad de tiempo se incrementó enormemente en comparación con el tipo silvestre, confirmando que las glucosidasas mutantes glucosiladas presentaban excelente eficiencia de degradación de celulosa.

[Ejemplo 15] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la glucosidasa mutante glucosilada (7)

De una manera similar al ejemplo 6, utilizando cada glucosidasa de tipo silvestre obtenida en el ejemplo comparativo 1 y el ejemplo comparativo 2 y cada glucosidasa mutante glucosilada obtenida en el ejemplo 1 y el ejemplo 10, se llevó a cabo la hidrólisis de lignocelulosa 3 (tratamiento hidrotérmico) preparada en el ejemplo de referencia 1. La cantidad de glucosa producida por cada glucosidasa después de 28 horas de reacción (g/l) se mostró en la tabla 8.

[Tabla 8]

No de entrada	Glucosidasa	Concentración de glucosa producida (g/l)	
		Glucosidasa de tipo silvestre (ejemplo comparativo 1, 2)	Glucosidasa mutante glucosilada (ejemplo 1, 10)
1	PfuBGL	4 g/l	11 g/l
2	ThAggBGY	4 g/l	12 g/l
3	CmGHFP	5 g/l	14 g/l
4	SaBGAL	5 g/l	14 g/l
5	SsoBGAL	4 g/l	12 g/l
6	PtBGAL	5 g/l	15 g/l
7	TvBGAL	4 g/l	13 g/l
8	FnGHFP	6 g/l	15 g/l

Tal como se muestra en la tabla 8, en la hidrólisis de lignocelulosa 3 tratada hidrotérmicamente, la producción de azúcar por las glucosidasas mutantes glucosiladas por unidad de tiempo se incrementó enormemente en comparación con el tipo silvestre, confirmando que las glucosidasas mutantes glucosiladas presentaban excelente eficiencia de degradación de celulosa.

[Ejemplo 16] Hidrólisis de pasta industrial utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y la glucosidasa mutante glucosilada

En la hidrólisis de pasta industrial, la cantidad de glucosa producida por la acción de cada glucosidasa de tipo silvestre obtenida en el ejemplo comparativo 1 y el ejemplo comparativo 2 y la producida por la acción de cada glucosidasa mutante glucosilada obtenida en el ejemplo 1 y el ejemplo 10 se estudiaron comparativamente. La hidrólisis se realizó de la misma manera que en el ejemplo 6 excepto por utilizar un tampón de acetato 50 mM (pH 5,0) en el que se suspendió pasta industrial al 5% en peso (fabricada por Toa Kasei Co., Ltd.) como sustrato. La cantidad de glucosa producida por cada glucosidasa después de 28 horas de reacción (g/l) se mostró en la tabla 9.

[Tabla 9]

No de entrada	Glucosidasa	Concentración de glucosa producida (g/l)	
		Glucosidasa de tipo silvestre (ejemplo comparativo 1, 2)	Glucosidasa mutante glucosilada (ejemplo 1, 10)
1	PfuBGL	9 g/l	12 g/l
2	ThAggBGY	8 g/l	11 g/l
3	CmGHFP	8 g/l	11 g/l
4	SaBGAL	10 g/l	13 g/l
5	SsoBGAL	10 g/l	12 g/l
6	PtBGAL	9 g/l	11 g/l
7	TvBGAL	8 g/l	10 g/l
8	FnGHFP	11 g/l	13 g/l

Tal como se muestra en la tabla 9, también en la hidrólisis de pasta industrial, la producción de azúcar por las glucosidasas mutantes glucosiladas por unidad de tiempo se incrementó enormemente en comparación con el tipo silvestre, confirmando que las glucosidasas mutantes glucosiladas presentaban excelente eficiencia de degradación de celulosa.

[Ejemplo 17] Selección del sitio de introducción de la mutación de glucosilación

En base a la información de la estructura terciaria de PfuBGL obtenida en el ejemplo 1, se llevó a cabo una búsqueda adicional para sitio de glucosilación. La protección del sitio catalítico por glucosilación se intentó introduciendo la secuencia de glucosilación alrededor de la hendidura donde tiene lugar la reacción enzimática. En primer lugar, el potencial sitio de introducción de la mutación de glucosilación estaba limitado, en la parte diferente del sitio de introducción de la mutación en la cadena de azúcares en PfuBGL descrita en el ejemplo 1, a la parte que está expuesta a la superficie de la enzima. Posteriormente, se buscó dicha posición que no causara el impedimento estérico y/o la deformación estructural por introducción de mutación de la secuencia de glucosilación Asn-Xaa-Thr (N-X-T). Además, en la parte donde se evitaba el sitio activo de glucosidasa, se seleccionaron tres sitios de introducción de la mutación.

Como resultado, además del sitio de glucosilación seleccionado en el ejemplo 1, se seleccionaron nuevamente tres sitios de introducción de la mutación, que fueron H37-D38-K39 (mutación A), S230-F231-E232 (mutación C) y A364-Y365-E366 (mutación E).

[Ejemplo 18] Preparación de la PfuBGL mutante glucosilada (2)

A efectos de introducir la secuencia de glucosilación en el sitio de introducción de la mutación determinado en el ejemplo 17 en la PfuBGL mutante glucosilada mostrada en SEQ ID NO: 6, utilizando cebadores para introducir la mutación A mostrada en SEQ ID NO: 57 y SEQ ID NO: 58, la mutación de la secuencia de glucosilación unida a N se introdujo mediante mutagénesis dirigida al sitio. Como resultado, se obtuvo el gen de PfuBGL2A mutante glucosilada de SEQ ID NO: 51. Además, en cuanto a la mutación C y la mutación E, utilizando cebadores para introducir la mutación C mostrada en SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60 y cebadores para introducir la mutación E mostrada en SEQ ID NO: 61 y SEQ ID NO: 62, respectivamente, la mutación de la secuencia de glucosilación unida a N se introdujo por mutagénesis dirigida al sitio de una manera similar, con lo que el gen de PfuBGL2C mutante glucosilado mostrado en SEQ ID NO: 53 y el gen de PfuBGL2E mutante glucosilado mostrado en SEQ ID NO: 55 se obtuvieron cada uno. Utilizando los genes mutantes glucosilados preparados como anteriormente, la PfuBGL2A mutante glucosilada representada por SEQ ID NO: 52, la PfuBGL2C mutante glucosilada representada por SEQ ID NO: 54, y la PfuBGL2E mutante glucosilada representada por SEQ ID NO: 56 se obtuvieron, cada una, siguiendo las mismas etapas que en el ejemplo 3.

[Ejemplo 19] Actividad enzimática de la PfuBGL mutante glucosilada (2)

De una manera similar al ejemplo 4, se midió la actividad enzimática de la glucosidasa mutante glucosilada PfuBGL2A (SEQ ID NO: 52), la PfuBGL2C mutante glucosilada (SEQ ID NO: 54) y la PfuBGL2E mutante glucosilada (SEQ ID NO: 56) obtenidas en el ejemplo 18 en comparación con la PfuBGL de tipo silvestre. Ajustando la actividad enzimática de la PfuBGL de tipo silvestre a 100, la actividad enzimática de la mutante glucosilada se mostró como actividad relativa (%) en la tabla 10.

[Tabla 10]

No de entrada	SEQ ID NO	Glucosidasa	Actividad relativa (%) de glucosidasa mutante glucosilada con respecto a tipo silvestre
9	52	PfuBGL2A	84
10	54	PfuBGL2C	81
11	56	PfuBGL2E	85

Tal como se muestra en la tabla 10, se descubrió que la glucosidasa mutante que tiene dos o más cadenas de azúcares fijadas a ella conservaba la actividad enzimática en comparación con la glucosidasa de tipo silvestre antes de la glucosilación.

[Ejemplo 20] Hidrólisis de lignocelulosa utilizando la composición enzimática compuesta por una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos y diversos tipos de glucosidasas mutantes glucosiladas (8)

De una manera similar al ejemplo 6, utilizando las glucosidasas mutantes glucosiladas (PfuBGL2A, PfuBGL2C y PfuBGL2E) obtenidas en el ejemplo 18, se llevó a cabo hidrólisis de lignocelulosa 2 (tratamiento con ácido sulfúrico diluido) preparada en el ejemplo de referencia 1. La cantidad de glucosa producida después de 28 horas de reacción (g/l) se mostró en la tabla 11.

[Tabla 11]

No de entrada	Glucosidasa	Concentración de glucosa producida (g/l)	
		Glucosidasa de tipo silvestre (ejemplo comparativo 1)	Glucosidasa mutante glucosilada (ejemplo 18)
1	PfuBGL	3 g/l	-
9	PfuBGL2A	-	18 g/l
10	PfuBGL2C	-	18 g/l
11	PfuBGL2E	-	19 g/l

Tal como se muestra en la tabla 11, se reveló que las glucosidasas mutantes que tienen dos o más cadenas de azúcares fijadas a ellas (SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56) también presentaban una eficiencia de degradación de lignocelulosa mejorada enormemente en comparación con una glucosidasa de tipo silvestre no glucosilada (ejemplo comparativo 1; la cantidad de glucosa producida: 3 g/l).

[Ejemplo 21] Evaluación de la capacidad de adsorción de la glucosidasa mutante glucosilada para lignocelulosa

Se evaluó la capacidad de adsorción de la glucosidasa mutante glucosilada para celulosa cristalina (Avicel) y para lignocelulosas 1 a 3 preparadas en el ejemplo de referencia 1. Como glucosidasa, se utilizaron la PfuBGL mutante glucosilada preparada en el ejemplo 1 y la PfuBGL de tipo silvestre preparada en el ejemplo comparativo 1, y las soluciones enzimáticas se ajustaron para tener actividades específicas iguales, y se prepararon adicionalmente a una concentración final de 100 mM mediante la adición de un tampón de acetato (pH 5). Las soluciones enzimáticas resultantes se añadieron, cada una, a la celulosa cristalina y a lignocelulosas 1 a 3 a una concentración final (concentración de sólido) del 7,5% en peso, y las mezclas resultantes se mantuvieron calientes y se agitaron a 50°C durante una hora. Posteriormente, las mezclas después de reacción se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante obtenido de este modo se midió para la actividad de degradación de celobiosa. Ajustando la actividad enzimática de una solución enzimática sin celulosa cristalina y lignocelulosas 1 a 3 en 100, la actividad de degradación de celobiosa se evaluó en términos de actividad relativa (%).

[Tabla 12]

Celulosa	Actividad relativa (%) de actividad de degradación de celobiosa (%)	
	PfuBGL de tipo silvestre	PfuBGL mutante glucosilada
Celulosa cristalina (Avicel)	85%	95%
Lignocelulosa 1 (Tratamiento con ácido sulfúrico diluido)	23%	84%
Lignocelulosa 2 (Tratamiento con amoníaco)	62%	84%
Lignocelulosa 3 (Tratamiento hidrotérmico)	34%	81%

Tal como se muestra en la tabla 12, se reveló que la actividad de degradación de celobiosa en el sobrenadante de la glucosidasa mutante glucosilada se incrementaba en presencia de cualquiera de las lignocelulosas 1 a 3, en comparación con la glucosidasa de tipo silvestre. Además, la actividad de degradación de celobiosa en el sobrenadante se incrementaba ligeramente también para Avicel, que era celulosa cristalina. A partir de los resultados anteriores, se reveló que la glucosidasa mutante glucosilada presentaba baja capacidad de adsorción particularmente para lignocelulosa (producto de celulosa de pretratamiento), y de este modo se recuperaría con buen rendimiento del sobrenadante después de separación sólido-líquido.

[Ejemplo 22] Evaluación de la capacidad de adsorción de la glucosidasa mutante glucosilada para una membrana de ultrafiltración

Se evaluó la capacidad de adsorción de la glucosidasa mutante glucosilada para una membrana de ultrafiltración. Como la membrana de ultrafiltración, se utilizó VIVASPIN20 (SARTORIUS K.K., hecha de polietersulfona, límite de peso molecular de 10000 Da). Como glucosidasa, se utilizaron la PfuBGL mutante glucosilada preparada en el ejemplo 1 y la PfuBGL preparada en el ejemplo comparativo 1, y las soluciones enzimáticas se ajustaron para tener actividades específicas iguales, y se prepararon adicionalmente a una concentración final de 50 mM mediante la adición de un tampón de acetato (pH 5). A partir de estas soluciones enzimáticas, se transfirieron 5 ml a la membrana de ultrafiltración VIVASPIN20, seguidos por centrifugado a 4000 G durante 10 minutos. Después del centrifugado, a la solución que permanecía en el lado no permeable de la membrana de ultrafiltración (aproximadamente 100 μ l o menos), se le añadieron 3 ml de un tampón de acetato 50 mM, y los productos residuales que quedaban sobre la superficie de la membrana de ultrafiltración y sobre la pared interna del recipiente se recogieron pipeteando. El producto residual recogido de este modo se enrasó a 5 ml y, a partir de esto, se muestrearon 10 μ l para la actividad de degradación de celobiosa. La serie de operaciones anterior se repitió siete veces, y ajustando la actividad inicial al 100 (%), la actividad de degradación de celobiosa se calculó como actividad relativa (%) en cada operación. Los resultados obtenidos de este modo se muestran en la tabla 13.

[Tabla 13]

Número de repetición de operación	Actividad relativa (%) de actividad de degradación de celobiosa (%)	
	PfuBGL de tipo silvestre	PfuBGL mutante glucosilada
0 (inicial)	100%	100%
1	21%	114%
2	5.4%	115%
3	1.8%	112%
4	ND	116%
5	ND	110%
6	ND	101%
7	ND	98%

Tal como se muestra en la tabla 13, se reveló que la actividad de la PfuBGL de tipo silvestre no glucosilada disminuía a medida que el número de repetición de la operación se incrementaba (la actividad desaparecía en la cuarta y posteriores operaciones). Mientras tanto, la PfuBGL mutante glucosilada seguía siendo activa incluso después de siete operaciones repetidas. Es decir, se reveló que la glucosidasa mutante glucosilada presentaba baja capacidad de adsorción para la membrana de ultrafiltración y, por lo tanto, se recuperaba con buen rendimiento cuando se recuperaba utilizando una membrana de ultrafiltración después de la reacción de hidrólisis.

[Ejemplo 23] Recuperación de la composición enzimática en el hidrolizado utilizando una membrana de ultrafiltración

A partir del producto de hidrólisis de lignocelulosas 1 a 3 en el ejemplo 7, la composición enzimática se recuperó de la siguiente manera. En primer lugar, se centrifugaron 10 ml del hidrolizado y se obtuvieron 5 ml del sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante se filtró a través de un filtro de membrana preciso que tenía un diámetro de poro promedio de 0,2 μ m (membrana de PVDF, fabricada por Millipore Corporation), y se recogió el filtrado. El volumen total del filtrado obtenido de este modo se transfirió a la membrana de ultrafiltración VIVASPIN20 (hecha de polietersulfona, un límite de peso molecular de 10000 Da), seguido por centrifugado. El producto residual que permanecía en el lado no permeable de la membrana de ultrafiltración se recogió y se midió para la actividad de degradación de celobiosa. Ajustando la actividad de la enzima introducida a la actividad enzimática inicial del 100%, la actividad enzimática de la composición enzimática recuperada como el producto residual se calculó en términos de valor relativo (%).

[Tabla 14]

Celulosa	Actividad relativa (%) de actividad de degradación de celobiosa de la enzima recuperada	
	PfuBGL de tipo silvestre	PfuBGL mutante glucosilada
Lignocelulosa 1 (Tratamiento con ácido sulfúrico diluido)	21%	69%
Lignocelulosa 2 (Tratamiento con amoníaco)	11%	51%
Lignocelulosa 3 (Tratamiento hidrotérmico)	7.7%	48%

Tal como se muestra en la tabla 14, se reveló que la actividad de la glucosidasa mutante glucosilada recuperada se incrementaba enormemente en comparación con la glucosidasa mutante. Se supuso que esto era atribuible a capacidad de adsorción reducida de la glucosidasa mutante glucosilada para lignocelulosa, tal como se demostró en el ejemplo 21, y también a capacidad de adsorción reducida de la glucosidasa mutante glucosilada para la membrana de ultrafiltración, tal como se demuestra en el ejemplo 22.

[Ejemplo 24] Análisis del componente de la cadena de azúcares de la glucosidasa mutante glucosilada

Se analizó la estructura de la cadena de azúcares de la PfuBGL glucosilada descrita en el ejemplo 1. A 1,33 mg de una muestra, que era PfuBGL glucosilada liofilizada (-80°C), se añadieron 1,33 ml de agua purificada para preparar una solución de muestra de 1 mg/ml. El azúcar neutro y aminoazúcar en esta solución de muestra se cuantificaron mediante el siguiente procedimiento.

1. Azúcar neutro

En un tubo de ensayo, se transfirieron 100 µl de la solución de muestra a 1 mg/ml, que se secaron a presión reducida, a los que se añadieron 200 µl de ácido trifluoroacético 2 M. El tubo de ensayo resultante se sometió a sustitución con nitrógeno y a continuación se selló a presión reducida. Posteriormente, la hidrólisis se realizó a 100°C durante seis horas, y el producto resultante se secó de nuevo a presión reducida. Al residuo obtenido de este modo, se le añadieron 200 µl de agua purificada, en los que se disolvió el residuo. La solución resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Una muestra obtenida diluyendo el filtrado 10 veces con agua purificada se analizó en las siguientes condiciones.

Como instrumento analítico, se utilizaron el sistema de HPLC LC20A system (Shimadzu Corporation) y el espectrofluorómetro RF-10AXL (Shimadzu Corporation).

Las condiciones analíticas fueron las siguientes; TSK-gel Sugar AXG 4,6 mm LD. × 15 cm (Tosoh Corporation), la temperatura de la columna, 70°C, la fase móvil, un tampón de borato potásico 0,6 M (pH 8,7), y el caudal de la fase móvil, 0,4 ml/min.

Utilizando arginina al 1% en peso y ácido bórico al 3% en peso como reactivo de reacción, el marcado post-columna se realizó a un caudal de reactivo de reacción de 0,5 ml/min y una temperatura de reacción de 150°C. Además, en cuanto a la longitud de onda de detección, la excitación y la detección se realizaron a 320 nm y 430 nm, respectivamente. El azúcar neutro se cuantificó en comparación con cada producto estándar de azúcar neutro.

2. Aminoazúcar

En un tubo de ensayo, se transfirieron 100 µl de la solución de muestra a 1 mg/ml, que se secaron a presión reducida, a los que se añadieron 200 µl de ácido triclorhídrico 4 M. El tubo de ensayo resultante se sometió a sustitución con nitrógeno y a continuación se selló a presión reducida. Posteriormente, la hidrólisis se realizó a 100°C durante seis horas, y a continuación el producto resultante se secó de nuevo a presión reducida. Al residuo obtenido de este modo, se le añadieron 200 µl de agua purificada, en los que se disolvió el residuo. La solución resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm.

Como instrumento analítico, se utilizaron el sistema de HPLC LC20A (Shimadzu Corporation) y el espectrofluorómetro RF-10AXL (Shimadzu Corporation).

Las condiciones analíticas fueron las siguientes; TSK-gel SCX 6 mm I.D. × 15 cm (Tosoh Corporation), la temperatura de la columna, 60°C, la fase móvil, un tampón de ácido bórico borato potásico 0,16 M (pH 7,6) y el caudal de la fase móvil, 0,3 ml/min.

Utilizando arginina al 1% en peso y ácido bórico al 3% en peso como reactivo de reacción, el marcado post-columna se realizó a un caudal de reactivo de reacción de 0,5 ml/min y una temperatura de reacción de 150°C. Además, en cuanto a la longitud de onda de detección, la excitación y la detección se realizaron a 320 nm y 430 nm, respectivamente. El azúcar neutro se cuantificó en comparación con cada producto estándar de azúcar neutro.

5

[Tabla 15]

Azúcar		Concentración	Relación de composición
		(nmol/mg)	(*1)
Azúcar neutro	Ramnosa	30	1
	Ribosa	ND	-
	Manosa	576	18
	Arabinosa	24	1
	Galactosa	75	2
	Xilosa	ND	-
	Glucosa	54	2
Aminoazúcar	Glucosamina	62	2
	Galactosamina	37	1

(*1) Ajustando el valor de la concentración B de glucosamina a "2" como el estándar, las concentraciones B de otros azúcares se calcularon como relación relativa. En el cálculo, los dígitos tras la coma decimal se redondearon a un número entero.

10 Tal como se muestra en la tabla 15, se reveló que el componente principal del azúcar neutro que compone la cadena de azúcares de la PfuBGL mutante en la cadena de azúcares obtenida en el ejemplo 1 era manosa. Además, a partir de la relación de composición de manosa con respecto a N-glucosamina, se descubrió que la PfuBGL mutante en la cadena de azúcares tenía una cadena de azúcares de tipo rica en manosa.

15 Aplicabilidad industrial

La glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo, según la presente invención, puede utilizarse para la producción de un líquido que contiene azúcar mediante degradación de celulosa. Dado que la glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo tiene un efecto de incrementar enormemente la eficiencia de degradación de celulosa, es capaz de reducir considerablemente el coste de la enzima. A la luz de lo anterior, la glucosidasa mutante glucosilada derivada de un termófilo, según la presente invención, es extremadamente beneficiosa desde el punto de vista industrial.

20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Glucosidasa glucosilada derivada de termófilo, procedimiento de producción y composición de celulosa

<130> PH-4632-PCT

<150> JP 2010-044242

<151> 01-03-2010

<160> 62

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 466

<212> PRT

<213> Trichoderma reesei

25 <400> 1

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

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

Phe Gly Val Thr Tyr Val Asp Tyr Glu Asn Gly Gln Lys Arg Phe Pro
435 440 445

Lys Lys Ser Ala Lys Ser Leu Lys Pro Leu Phe Asp Glu Leu Ile Ala
450 455 460

Ala Ala
465

<210> 2

<211> 434

<212> PRT

<213> Aspergillus niger

<400> 2

Met Leu Pro Lys Asp Leu Gln Trp Gly Phe Ala Lys Ala Ala Tyr Gln
1 5 10 15

Ile Glu Gly Ala Val Asp Gln Asp Gly Arg Gly Pro Ser Ile Trp Asp
20 25 30

Thr Phe Cys Ala Gln Pro Gly Lys Ile Ala Asp Gly Ser Ser Gly Val
35 40 45

Thr Ala Cys Asp Ser Tyr Asn Arg Thr Ala Glu Asp Ile Ala Leu Leu
50 55 60

Lys Ser Leu Gly Ala Lys Ser Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Ser Arg Ile
65 70 75 80

Pro Glu Gly Gly Arg Gly Asp Ala Val Asn Gln Ala Gly Ile Asp His
85 90 95

Tyr Val Lys Phe Val Asp Asp Leu Leu Asp Ala Gly Ile Thr Pro Phe
100 105 110

Ile Thr Leu Phe His Trp Asp Leu Leu His Gln Arg Tyr Gly Gly Leu
115 120 125

Leu Asn Arg Thr Glu Phe Pro Leu Asp Phe Glu Asn Tyr Ala Arg Val
130 135 140

Met Phe Arg Ala Leu Pro Lys Val Arg Asn Trp Asn Glu Pro Leu Cys
145 150 155 160

Ser Ala Ile Pro Gly Tyr Gly Ser Gly Ser Phe Ala Pro Gly Arg Gln
165 170 175

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

ES 2 544 710 T3

<210> 3
 <211> 1419
 <212> ADN
 <213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 3

```

atggcaaagt tcccaaaaaa cttcatgttt ggatattctt ggtctggttt ccagtttgag      60
atgggactgc caggaagtga agtggaaagc gactgggtggg tgtgggttca cgacaaggag      120
aacatagcat caggtctagt aagtggagat ctaccagaga acggcccagc atattggcac      180
ctctataagc aagatcatga cattgcagaa aagctaggaa tggattgtat tagagggtggc      240
attgagtggg caagaatttt tccaaagcca acatttgacg ttaaagttga tgtggaaaag      300
gatgaagaag gcaacataat ttccgtagac gttccagaga gtacaataaa agagctagag      360
aaaattgcc aacatggaggc ccttgaacat tatcgcaaga tttactcaga ctggaaggag      420
agggggcaaaa ccttcatatt aaacctctac cactggcctc ttccattatg gattcatgac      480
ccaattgcag taaggaaact tggcccggat agggctcctg caggatggtt agatgagaag      540
acagtggtag agtttgtgaa gtttgccgcc ttcgttgctt atcaccttga tgacctcggt      600
gacatgtgga gcacaatgaa cgaaccaaac gtagtctaca atcaaggtta cattaatcta      660
cgttcaggat ttccaccagg atatctaagc tttgaagcag cagaaaaggc aaaattcaac      720
ttaattcagg ctcacatcgg agcatatgat gccataaaag agtattcaga aaaatccgtg      780
ggagtgatat acgcctttgc ttggcacgat cctctagcgg aggagtataa ggatgaagta      840
gaggaaatca gaaagaaaga ctatgagttt gtaacaattc tacactcaaa aggaaagcta      900
gactggatcg gcgtaaacta ctactccagg ctggtatatg gagccaaaga tggacaccta      960
gttcctttac ctggatatgg atttatgagt gagagaggag gatttgcaaa gtcaggaaga     1020
cctgctagtg actttggatg ggaaatgtac ccagagggcc ttgagaacct tcttaagtat     1080
ttaacaatg cctacgagct accaatgata attacagaga acggtatggc cgatgcagca     1140
gatagataca ggccacacta tctcgtaagc catctaaagg cagtttacia tgctatgaaa     1200
gaagggtgctg atgttagagg gtatctccac tgggtctctaa cagacaacta cgaatggggc     1260
caagggttca ggatgagatt tggattggtt tacgtggatt tcgagacaaa gaagagatat     1320
ttaaggccaa gcgccctggt attcagagaa atagccactc aaaaagaaat tccagaagaa     1380
ttagctcacc tcgcagacct caaatttggtt acaagaaag                                     1419
  
```

<210> 4
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> *Pyrococcus furiosus*

<400> 4

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

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

<210> 5

<211> 1419

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación

<400> 5

```

atggcaaagt tcccaaaaaa cttcatgttt ggatattctt ggtctggttt ccagtttgag      60

atgggactgc caggaagtga agtggaaagc gactggtggg tgtgggttca cgacaaggag      120
aacatagcat caggtctagt aagtggagat ctaccagaga acggcccagc atattggaac      180
cgcactaagc aagatcatga cattgcagaa aagctaggaa tggattgtat tagaggtggc      240
attgagtggg caagaatttt tccaaagcca acatttgacg ttaaagttga tgtggaaaag      300
gatgaagaag gcaacataat ttccgtagac gttccagaga gtacaataaa agagctagag      360
aaaattgcca acatggaggc ccttgaacat tatcgcaaga tttactcaga ctggaaggag      420
agggggcaaaa ccttcatatt aaacctctac cactggcctc ttccattatg gattcatgac      480
ccaattgcag taaggaaact tggcccggat agggctcctg caggatggtt agatgagaag      540
acagtggtag agtttgtgaa gtttgccgcc ttcgttgctt atcaccttga tgacctcgtt      600
gacatgtgga gcacaatgaa cgaaccaaac gtagtctaca atcaaggtta cattaatcta      660
cgttcaggat ttccaccagg atatctaagc tttgaagcag cagaaaaggc aaaattcaac      720
ttaattcagg ctcacatcgg agcatatgat gccataaaaag agtattcaga aaaatccgtg      780
ggagtgatat acgcctttgc ttggcacgat cctctagcgg aggagtataa ggatgaagta      840
gaggaaatca gaaagaaaga ctatgagttt gtaacaattc tacactcaaa aggaaagcta      900
gactggatcg gcgtaaaacta ctactccagg ctggtatatg gagccaaaga tggacaccta      960
gttccttttac ctggatatgg atttatgagt gagagaggag gatttgcaaa gtcaggaaga     1020
cctgctagtg actttggatg ggaaatgtac ccagaggggc ttgagaacct tcttaagtat     1080
ttaaacaatg cctacgagct accaatgata attacagaga acggtatggc cgatgcagca     1140
gatagataca ggccacacta tctcgtaagc catctaaagg cagtttacaa tgctatgaaa     1200
gaaggtgctg atgttagagg gtatctccac tggctctctaa cagacaacta cgaatgggcc     1260
caaggggttca ggatgagatt tggattggtt tacgtggatt tcgagacaaa gaagagatat     1320
ttaaggccaa gcgccctggt attcagagaa atagccactc aaaaagaaat tccagaagaa     1380
ttagctcacc tcgcagacct caaatttgtt acaagaaag                                1419

```

<210> 6

<211> 473

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (60)..(62)

<223>

<400> 6

Met	Ala	Lys	Phe	Pro	Lys	Asn	Phe	Met	Phe	Gly	Tyr	Ser	Trp	Ser	Gly
1				5					10					15	

Phe Gln Phe Glu Met Gly Leu Pro Gly Ser Glu Val Glu Ser Asp Trp
 20 25 30

Trp Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser
 35 40 45

Gly Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Ala Tyr Trp Asn Arg Thr Lys Gln
 50 55 60

Asp His Asp Ile Ala Glu Lys Leu Gly Met Asp Cys Ile Arg Gly Gly
 65 70 75 80

Ile Glu Trp Ala Arg Ile Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys Val
 85 90 95

Asp Val Glu Lys Asp Glu Glu Gly Asn Ile Ile Ser Val Asp Val Pro
 100 105 110

Glu Ser Thr Ile Lys Glu Leu Glu Lys Ile Ala Asn Met Glu Ala Leu
 115 120 125

Glu His Tyr Arg Lys Ile Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Lys Thr
 130 135 140

Phe Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Ile His Asp
 145 150 155 160

Pro Ile Ala Val Arg Lys Leu Gly Pro Asp Arg Ala Pro Ala Gly Trp
 165 170 175

Leu Asp Glu Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Phe Ala Ala Phe Val
 180 185 190

Ala Tyr His Leu Asp Asp Leu Val Asp Met Trp Ser Thr Met Asn Glu
 195 200 205

Pro Asn Val Val Tyr Asn Gln Gly Tyr Ile Asn Leu Arg Ser Gly Phe
 210 215 220

Pro Pro Gly Tyr Leu Ser Phe Glu Ala Ala Glu Lys Ala Lys Phe Asn
 225 230 235 240

Leu Ile Gln Ala His Ile Gly Ala Tyr Asp Ala Ile Lys Glu Tyr Ser
 245 250 255

Glu Lys Ser Val Gly Val Ile Tyr Ala Phe Ala Trp His Asp Pro Leu
 260 265 270

Ala Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr
275 280 285

Glu Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly
290 295 300

Val Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu
305 310 315 320

Val Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala
325 330 335

Lys Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu
340 345 350

Gly Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro
355 360 365

Met Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg
370 375 380

Pro His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys
385 390 395 400

Glu Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn
405 410 415

Tyr Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val
420 425 430

Asp Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe
435 440 445

Arg Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu
450 455 460

Ala Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys
465 470

<210> 7

<211> 1446

<212> ADN

<213> Thermosphaera aggregans

<400> 7

atgaaattcc ccaaagactt catgataggc tactcatctt caccgtttca atttgaagct	60
ggtattcccg ggtccgagga tccgaatagt gattggtggg tatgggtgca tgatccggag	120
aacacagcag ctggactagt cagcggcgat tttcccagaga acggcccagg ttactggaat	180
ttaaaccaaa atgaccacga cctggctgag aagctggggg ttaacactat tagagtaggc	240
gttgagtgga gtaggatttt tccaaagcca actttcaatg ttaaagtccc tgtagagaga	300
gatgagaacg gcagcattgt tcacgtagat gtcgatgata aagcggttga aagacttgat	360
gaattagcca acaaggaggc cgtaaaccat tacgtagaaa tgtataaaga ctgggttgaa	420
agaggtagaa aacttatact caatttatac cattggcccc tgcctctctg gcttcacaac	480
ccaatcatgg tgagaagaat gggcccggac agagcggcct caggctggct taacgaggag	540
tccgtggtgg agtttgccaa atacgccgca tacattgctt ggaaaatggg cgagctacct	600
gttatgtgga gcaccatgaa cgaacccaac gtcgtttatg agcaaggata catgttcgtt	660
aaaggggggtt tcccacccgg ctacttgagt ttggaagctg ctgataaggc caggagaaat	720
atgatccagg ctcatgcacg ggcctatgac aatattaaac gcttcagtaa gaaacctgtt	780
ggactaatat acgctttcca atggttcgaa ctattagagg gtccagcaga agtatttgat	840
aagtttaaga gctctaagtt atactatttc acagacatag tatcgaaggg tagttcaatc	900
atcaatgttg aatacaggag agatcttgcc aataggctag actggttggg cgtaaactac	960
tatagccgtt tagtctacaa aatcgtcgat gacaaaccta taatcctgca cgggtatgga	1020
ttcctttgta cacctggggg gatcagcccg gctgaaaatc cttgtagcga ttttgggtgg	1080
gaggtgtatc ctgaaggact ctacctactt ctaaaagaac ttacaaccg atacggggta	1140
gacttgatcg tgaccgagaa cggtgtttca gacagcaggg atgcgttgag accggcatac	1200
ctggtctcgc atgtttacag cgtatggaaa gccgctaacg agggcattcc cgtcaaaggc	1260
tacctccact ggagcttgac agacaattac gagtgggccc agggcttcag gcagaaattc	1320
ggtttagtca tggttgactt caaaactaag aaaaggatat tccgcccaag cgccctagtg	1380
ttccgggaga tcgcaacgca taacggaata ccggatgagc tacagcatct tacactgac	1440
cagtaa	1446

<210> 8

<211> 481

<212> PRT

<213> Thermosphaera aggregans

<400> 8

ES 2 544 710 T3

Met Lys Phe Pro Lys Asp Phe Met Ile Gly Tyr Ser Ser Ser Pro Phe
1 5 10 15

Gln Phe Glu Ala Gly Ile Pro Gly Ser Glu Asp Pro Asn Ser Asp Trp
20 25 30

Trp Val Trp Val His Asp Pro Glu Asn Thr Ala Ala Gly Leu Val Ser
35 40 45

Gly Asp Phe Pro Glu Asn Gly Pro Gly Tyr Trp Asn Leu Asn Gln Asn

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

Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Lys Ile Val Asp Asp Lys Pro Ile Ile Leu
325 330 335

His Gly Tyr Gly Phe Leu Cys Thr Pro Gly Gly Ile Ser Pro Ala Glu
340 345 350

Asn Pro Cys Ser Asp Phe Gly Trp Glu Val Tyr Pro Glu Gly Leu Tyr
355 360 365

Leu Leu Leu Lys Glu Leu Tyr Asn Arg Tyr Gly Val Asp Leu Ile Val
370 375 380

Thr Glu Asn Gly Val Ser Asp Ser Arg Asp Ala Leu Arg Pro Ala Tyr
385 390 395 400

Leu Val Ser His Val Tyr Ser Val Trp Lys Ala Ala Asn Glu Gly Ile
405 410 415

Pro Val Lys Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr Glu Trp
420 425 430

Ala Gln Gly Phe Arg Gln Lys Phe Gly Leu Val Met Val Asp Phe Lys
435 440 445

Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg Glu Ile
450 455 460

Ala Thr His Asn Gly Ile Pro Asp Glu Leu Gln His Leu Thr Leu Ile
465 470 475 480

Gln

<210> 9

<211> 1461

<212> ADN

<213> Caldivirga maquilingensis

<400> 9

atgattaagt tcccaagcga cttcagattc ggcttctcca cagtgggtac tcagcatgag	60
atgggtaccc ctggttctga attcgtaagt gactggtatg tgtggcttca tgaccctgag	120
aacattgctt cgggcttagt tagcgggtgat ttacctgaac atgggccagg ttactgggac	180
ttgtataagc aggaccactc aatagctagg gatcttgggc ttgatgcagc atggataact	240
attgagtggg ctagggtggt ccctaagccg acctttgacg ttaaggttaa ggttgatgag	300
gatgatggag gtaacgtggt tgacgttgag gttaatgaat cagcattaga ggagttacgc	360
aggctagctg acttaaagtc tgtaatacac tataggggga ttttaagtga ttggaaggag	420
aggggtggtt tactggtgat taacctttac cactgggcta tgcctacgtg gcttcatgac	480
ccaatagccg ttaggaagaa tggacctgat agagccccct ccggttggct tgataagaga	540
tccgttattg agttcactaa gttcgcagcc ttcatagccc atgagttagg tgacttagct	600
gacatgtggt atacgatgaa tgaacctggg gtagtgataa ctgaggggta cctttacgtt	660
aagtcaggct tcccaccagg ttacctggac ttaaactccc tagccactgc gggtaagcat	720
ttaattgagg ctcatgccag agcctaogac gccattaaag cctactcaag gaaaccagtg	780
ggcctagtct actccttcgc agactatcag ccgcttaggc agggatga gaggctggt	840
aaggaggcta agggacttga ctactcatc ttcgacgctc caattaaggg tgaattaatg	900
ggggttacta gggatgactt gaagggtagg cttgactgga ttggggtaaa ctactacact	960
agggccgtat tgaggaggag gcaggatgct ggtcgggcat cagtagccgt ggtggatgga	1020
ttcgggtact cctgtgaacc tggaggcgta tctaatagata ggagaccatg cagtgacttc	1080
ggctgggaaa tataccctga ggggtgtttac aatgtcttaa tggacctatg gaggaggtat	1140
aggatgcca tgtacatcac tgagaacggt atagctgatg agcatgataa gtggagggtca	1200
tggttcatag tatcgcacct gtatcaaatt cacagggcca tggaggaggg ggtggatggt	1260
agagggtact tccactggaa cctaatagat aacttggagt gggctgcagg atataggatg	1320
aggttcggcc tagtttacgt tgactatgca accaagagga ggtattttag gccaaagcgc	1380
ctggttatga gggaggtggc taaacagaag gctataccgg attacttaga gcattacatt	1440
aaaccaccta gaattgaatg a	1461

<210> 10

<211> 486

<212> PRT

<213> Caldivirga maquilingensis

<400> 10

ES 2 544 710 T3

Met Ile Lys Phe Pro Ser Asp Phe Arg Phe Gly Phe Ser Thr Val Gly
1 5 10 15

Thr Gln His Glu Met Gly Thr Pro Gly Ser Glu Phe Val Ser Asp Trp
20 25 30

Tyr Val Trp Leu His Asp Pro Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val Ser
35 40 45

Gly Asp Leu Pro Glu His Gly Pro Gly Tyr Trp Asp Leu Tyr Lys Gln
50 55 60

Asp His Ser Ile Ala Arg Asp Leu Gly Leu Asp Ala Ala Trp Ile Thr
65 70 75 80

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

340	345	350
Asp Arg Arg Pro Cys Ser Asp Phe Gly Trp Glu Ile Tyr Pro Glu Gly		
355	360	365
Val Tyr Asn Val Leu Met Asp Leu Trp Arg Arg Tyr Arg Met Pro Met		
370	375	380
Tyr Ile Thr Glu Asn Gly Ile Ala Asp Glu His Asp Lys Trp Arg Ser		
385	390	400
Trp Phe Ile Val Ser His Leu Tyr Gln Ile His Arg Ala Met Glu Glu		
405	410	415
Gly Val Asp Val Arg Gly Tyr Phe His Trp Asn Leu Ile Asp Asn Leu		
420	425	430
Glu Trp Ala Ala Gly Tyr Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val Asp		
435	440	445
Tyr Ala Thr Lys Arg Arg Tyr Phe Arg Pro Ser Ala Leu Val Met Arg		
450	455	460
Glu Val Ala Lys Gln Lys Ala Ile Pro Asp Tyr Leu Glu His Tyr Ile		
465	470	475
Lys Pro Pro Arg Ile Glu		
485		

<210> 11
 <211> 1476
 <212> ADN
 <213> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 11

atgttatcat tcccaaaggg tttcaaattt ggctggtctc agtcgggatt ccagtctgaa	60
atgggaactc caggtagcga ggatccgaac agcgattggc acgtctgggt tcatgacagg	120
gagaacatag tctcacagggt tgtcagtggg gattttacccg aaaatggtcc aggggtactgg	180
gggaactata agagatttca tgacgaagca gagaaaatag gactaaatgc agtgagaatt	240
aacgtagagt ggagtagaat atttcccaga ccactaccca agcctgaaat gcaaacaggg	300
actgataaag agaacagtcc tgtcattagc gtagacttaa atgagtctaa gctgagagaa	360
atggacaact acgctaataca tgaagcgta tcacattaca ggcaaatact ggaggatcta	420
agaaacagag gattttcacat agtactgaac atgtatcatt ggactttgcc catatggttg	480
cacgacccta tcagagttag gagaggagac tttacaggac caacagggtg gttaaactcc	540
aggacagttt atgagttcgc taggttctcg gcttacgtag cctggaaatt agatgatttg	600
gcgagtgaat atgcaacaat gaatgaacct aacgtggttt ggggagcagg ttacgctttt	660
cctagagcag gctttccacc taattacctt agcttcaggc tttcagaaat agctaaatgg	720
aatataattc aggcctcatgc gagggcttat gacgccatca agagcgtatc aaaaaagagt	780
gtaggtataa tatatgcaaa cacatcatat taccactca gaccacaaga taacgaagct	840
gtggaaatag cagagagatt gaacagatgg agtttctttg actccattat aaagggagag	900
ataactagtg agggacaaaa tgtcagagag gacttaagga acaggttaga ctggattggc	960
gtaaactatt acacgaggac tgtggttaaca aaagctgaga gtggttattt aacccttccg	1020
ggttatggag atcgttgtga aaggaactca ttgagtttag ctaacctccc taccagtgat	1080
ttcggttggg agttctttcc tgagggtcta tatgatgtac ttttgaagta ttggaatagg	1140
tatgggttac cattatacgt aatggagaac ggtatcgctg atgacgctga ctaccaaaga	1200
ccgtattact tagtatcaca tatctaccag gtgcacaggg ctttaaacga gggagtagat	1260
gtaagagggt atcttcattg gtctttggca gataattatg agtggtcgtc aggtttttca	1320
atgaggttcg gtctacttaa ggtagattat ctaacaaaga gattgtactg gagaccttct	1380
gcattagttt acagggagat tactaggagt aacggtatcc ctgaggagct ggaacatcta	1440
aacagagtac caccaataaa acctttgaga cattaa	1476

<210> 12

<211> 491

<212> PRT

<213> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 12

ES 2 544 710 T3

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

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

Gly Leu Tyr Asp Val Leu Leu Lys Tyr Trp Asn Arg Tyr Gly Leu Pro
370 375 380

Leu Tyr Val Met Glu Asn Gly Ile Ala Asp Asp Ala Asp Tyr Gln Arg
385 390 395 400

Pro Tyr Tyr Leu Val Ser His Ile Tyr Gln Val His Arg Ala Leu Asn
405 410 415

Glu Gly Val Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Ala Asp Asn
420 425 430

Tyr Glu Trp Ser Ser Gly Phe Ser Met Arg Phe Gly Leu Leu Lys Val
435 440 445

Asp Tyr Leu Thr Lys Arg Leu Tyr Trp Arg Pro Ser Ala Leu Val Tyr
450 455 460

Arg Glu Ile Thr Arg Ser Asn Gly Ile Pro Glu Glu Leu Glu His Leu
465 470 475 480

Asn Arg Val Pro Pro Ile Lys Pro Leu Arg His
485 490

<210> 13

<211> 1470

<212> ADN

<213> Sulfolobus solfataricus

<400> 13

atgtactcat	ttccaaatag	cttttaggttt	ggttggtccc	aggccggatt	tcaatcagaa	60
atgggaacac	cagggtcaga	agatccaaat	actgactggt	ataaatgggt	tcatgatcca	120
gaaaacatgg	cagcgggatt	agtaagtgga	gatctaccag	aaaatgggcc	aggctactgg	180
ggaaactata	agacatttca	cgataatgca	caaaaaatgg	gattaaaaat	agctagacta	240
aatgtggaat	ggtctaggat	atttcctaata	ccattaccaa	ggccacaaaa	ctttgatgaa	300
tcaaaacaag	atgtgacaga	ggttgagata	aacgaaaacg	agttaaagag	acttgacgag	360
tacgctaata	aagacgcatt	aaaccattac	agggaaatat	tcaaggatct	taaaagtaga	420
ggactttact	ttataactaaa	catgtatcat	tggccattac	ctctatggtt	acacgaccca	480
ataagagtaa	gaagaggaga	ttttactgga	ccaagtgggt	ggctaagtac	tagaacagtt	540
tacgaattcg	ctagattctc	agcttatata	gcttggaat	tcgatgatct	agtggatgag	600
tactcaacaa	tgaatgaacc	taacgttggt	ggaggtttag	gatacgttgg	tgtaagtcc	660
ggttttccc	caggatacct	aagctttgaa	ctttcccgta	gggcaatgta	taacatcatt	720
caagctcacg	caagagcgta	tgatgggata	aagagtgttt	ctaaaaaacc	agttggaatt	780
atttacgcta	atagctcatt	ccagccgtta	acggataaag	atatggaagc	gtagagatg	840
gctgaaaatg	ataatagatg	gtggttcttt	gatgctataa	taagaggtga	gatcaccaga	900
ggaaacgaga	agattgtaag	agatgaccta	aagggtagat	tggattggat	tggagttaat	960
tattacacta	ggactgttgt	gaagaggact	gaaaagggat	acgttagctt	aggaggttac	1020
ggtcacggat	gtgagaggaa	ttctgtaagt	ttagcgggat	taccaaccag	cgacttcggc	1080
tgggagttct	tcccagaagg	tttatatgac	gttttgacga	aatactggaa	tagatatcat	1140
ctctatatgt	acgttactga	aaatggtatt	gcggatgatg	ccgattatca	aaggccctat	1200
tatttagtat	ctcacgttta	tcaagttcat	agagcaataa	atagtgggtc	agatgttaga	1260
gggtatttac	attggtctct	agctgataat	tacgaatggg	cttcaggatt	ctctatgagg	1320
tttggctctgt	taaaggtcga	ttacaacact	aagagactat	actggagacc	ctcagcacta	1380
gtatataggg	aaatcgccac	aaatggcgca	ataactgatg	aaatagagca	cttaaatagc	1440
gtacctccag	taaagccatt	aaggcactaa				1470

<210> 14

<211> 489

<212> PRT

<213> Sulfolobus solfataricus

<400> 14

ES 2 544 710 T3

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

Ile Leu Asn Met Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Leu His Asp Pro
 145 150 155 160

Ile Arg Val Arg Arg Gly Asp Phe Thr Gly Pro Ser Gly Trp Leu Ser
 165 170 175

Thr Arg Thr Val Tyr Glu Phe Ala Arg Phe Ser Ala Tyr Ile Ala Trp
 180 185 190

Lys Phe Asp Asp Leu Val Asp Glu Tyr Ser Thr Met Asn Glu Pro Asn
 195 200 205

Val Val Gly Gly Leu Gly Tyr Val Gly Val Lys Ser Gly Phe Pro Pro
 210 215 220

Gly Tyr Leu Ser Phe Glu Leu Ser Arg Arg Ala Met Tyr Asn Ile Ile
 225 230 235 240

Gln Ala His Ala Arg Ala Tyr Asp Gly Ile Lys Ser Val Ser Lys Lys
 245 250 255

Pro Val Gly Ile Ile Tyr Ala Asn Ser Ser Phe Gln Pro Leu Thr Asp
 260 265 270

Lys Asp Met Glu Ala Val Glu Met Ala Glu Asn Asp Asn Arg Trp Trp
 275 280 285

Phe Phe Asp Ala Ile Ile Arg Gly Glu Ile Thr Arg Gly Asn Glu Lys
 290 295 300

Ile Val Arg Asp Asp Leu Lys Gly Arg Leu Asp Trp Ile Gly Val Asn
 305 310 315 320

Tyr Tyr Thr Arg Thr Val Val Lys Arg Thr Glu Lys Gly Tyr Val Ser
 325 330 335

Leu Gly Gly Tyr Gly His Gly Cys Glu Arg Asn Ser Val Ser Leu Ala
 340 345 350

Gly Leu Pro Thr Ser Asp Phe Gly Trp Glu Phe Phe Pro Glu Gly Leu
 355 360 365

Tyr Asp Val Leu Thr Lys Tyr Trp Asn Arg Tyr His Leu Tyr Met Tyr
 370 375 380

Val Thr Glu Asn Gly Ile Ala Asp Asp Ala Asp Tyr Gln Arg Pro Tyr
 385 390 395 400

Tyr Leu Val Ser His Val Tyr Gln Val His Arg Ala Ile Asn Ser Gly
405 410 415

Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Ala Asp Asn Tyr Glu
420 425 430

Trp Ala Ser Gly Phe Ser Met Arg Phe Gly Leu Leu Lys Val Asp Tyr
435 440 445

Asn Thr Lys Arg Leu Tyr Trp Arg Pro Ser Ala Leu Val Tyr Arg Glu
450 455 460

Ile Ala Thr Asn Gly Ala Ile Thr Asp Glu Ile Glu His Leu Asn Ser
465 470 475 480

Val Pro Pro Val Lys Pro Leu Arg His
485

<210> 15

<211> 1488

<212> ADN

<213> *Picrophilus torridus*

<400> 15

atgttaccca agaacttttt acttggtttt tctctggctg gctttcagtc tgaaatgggc	60
atatcagatc ctgatagcaa ttcagattgg tggttatggg tacatgaccc ggtgaatata	120
aggactggac ttgtatctgg tgacttacct gaaaatggaa taggatactg ggatctttac	180
aaaaaatata atggtctggc tgttcaaaca ggaatgaatg ctgcaaggct tggagttgaa	240
tggagcagga tatttcctaaa aagtactgaa gaagtaaagg tgatggaaga ttacaaagat	300
gatgatttaa tttccgtgga tgттаатgag ggaagtcttg aaaaacttga cagactggca	360
aatcaaaagg caattaatag atatatggaa atcttcaata atatcaagga aaataatatg	420
acgctaatag tgaatgttta ccattggcca ataccaatat atcttcacga tccaatagaa	480
gctaggaata gtggactttc aaataaaaga aatggctggc ttaatcataa aaccgttgtg	540
gaatttgtaa aatatgcaaa atatctggca tggaaattta gcgatgtggc agatatgttt	600
tctataatga atgagccaaa cgttgtattt ggtaatggat attttaatgt taaatcaggg	660
ttcccaccag catttcctaa tgtgcatggc ggtttgcttg caaaaaaaca tgaaattgag	720
gctatagcaa gatcatagca cgccatgaag gagattacaa aaaaaccagt tggctctaatt	780
atggcaaatt cagatgtaca accactaaca gatgaggata aagaagcagc agaaatggct	840
acttacaatg atcgctattc attcatagat ccgctaagag ttggtgagat gaaatgggct	900
gatgaggtta ctgcaggtaa tccaattggt gaaaagagca acatcgatag atctgatcta	960
aaaaataagc tagactggat aggtgttaac tattatacaa gggccgttgt aaaaaaatct ,	1020
ggaacggat atacaacatt aaaaggatat ggacactctg caaccgctgg catgccaagt	1080
agggccggaa gggatgtaag tgactttggc tgggaattct atccagaagg tcttgtaaac	1140
gtcttatcat catactggaa aagatatcac attccaatga ttgtgactga aaatggtgtt	1200
gctgactcta ttgatagact tagaccaagg taccttgtgt cacatataaa gtctgttgaa	1260
aaggctttat ctatgggtat ggatattagg ggatatcttc actggtctct gattgataac	1320
tatgaatggg catcaggttt ttcaatgaaa tttgggcttt atggtattga tttgaacaat	1380
aaaaagattc aacacagacc aagtgcactg gtattttaaag aaattgcaaa tgccaacgga	1440
gtcccggagg aatttgaatg gatggcagac cagcatcaga attcatga	1488

<210> 16

<211> 495

<212> PRT

<213> *Picrophilus torridus*

<400> 16

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

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

ES 2 544 710 T3

Leu His Trp Ser Leu Ile Asp Asn Tyr Glu Trp Ala Ser Gly Phe Ser
435 440 445

Met Lys Phe Gly Leu Tyr Gly Ile Asp Leu Asn Asn Lys Lys Ile Gln
450 455 460

His Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Lys Glu Ile Ala Asn Ala Asn Gly
465 470 475 480

Val Pro Glu Glu Phe Glu Trp Met Ala Asp Gln His Gln Asn Ser
485 490 495

<210> 17

<211> 1446

<212> ADN

<213> Thermoplasma volcanium

<400> 17

atggtagaaa acaatthttcc agaggatttc aaatthtggtt ggtcacagtc aggtthttcaa	60
tccggagatgg gctatgataa cgcaatggac gataaaaagtg actggtatgt ctgggttcat	120
gataaagaaa acatccaatc agggcttgta agcggagaca tgcccgaana tggtccgggt	180
tactggaata actataaatc attccatgaa gctgcacaga atatgggatt aaaaatggca	240
agaatcggag ttgaatggtc aagattattc ccggaaccctt tcccggaaaa aataatggca	300
gatgcaaaaa ataattcctt agaaataaac aataacattc tttcagaact tgataaatat	360
gtcaataaag atgcactcaa ccattacatt gagatattta atgatatcaa aaatagaaat	420
atagatttaa taattaatat gtaccactgg ccacttcctg tatggctaag cgatcctgta	480
tctgttagaa aaggaataaa aacagaaaga tcaggctggc tgaatgacag gatagttcaa	540
ttgtttgctt tattctcttc gtatatagta tataaaatgg aagatctggc agttgcattt	600
tcaaccatga atgaacctaa tgttgtttat ggaaatgggt ttataaatat caaatcaggt	660
tttccgcctt cctatctcag ttcagaattt gcatctaaag ttaagaacaa tatattaaaa	720
gcacattctc ttgcatacga ttctatgaaa aaaattacgg ataaacctgt gggaataatt	780
tatgcaaaca catatthttac gcctthggat ccggaaaaag ataatgatgc tattgctaaa	840
gcagacagtg atgcgaaatg gtcattthtt gatccattaa taaaaggaga taaatcactt	900
ggaattaatg gcaataaact agattggatc ggaattaatt attatacaag gacaatgtta	960
aggaaagacg gagatggcta tathttcata aaaggctatg gtcattcagg ttctcctaath	1020
actgtaacaa acgataaaaag accaacaagt gatataggat gggaattcta tccggagggga	1080
ttggaatatg taattatgaa ttactggaac aggtataaat tgcctatgta cgtaacagaa	1140
aatggcatag ccgataatgg ggattatcag aggccttatt atttagthttc acacattgca	1200
agtgtactga gggcaataaa taaaggagcc aatgtaaagg gttatttgca ctggtcctta	1260
gthgataaath atgaatgggc attgggattt agcccgaath ttggtthtaath aggatacgat	1320
gaaaaataaaa aactatactg gaggccaaagt gctcttgtht ataaggaaath agcaacaaaa	1380
aattgcatath cccagaath aaagcacctc gattcaatac cgcctataaa tggthtaaga	1440
aaataa	1446

<210> 18

<211> 481

<212> PRT

<213> Thermoplasma volcanium

<400> 18

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

Met Glu Asp Leu Ala Val Ala Phe Ser Thr Met Asn Glu Pro Asn Val
 195 200 205
 Val Tyr Gly Asn Gly Phe Ile Asn Ile Lys Ser Gly Phe Pro Pro Ser
 210 215 220
 Tyr Leu Ser Ser Glu Phe Ala Ser Lys Val Lys Asn Asn Ile Leu Lys
 225 230 235 240
 Ala His Ser Leu Ala Tyr Asp Ser Met Lys Lys Ile Thr Asp Lys Pro
 245 250 255
 Val Gly Ile Ile Tyr Ala Asn Thr Tyr Phe Thr Pro Leu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Lys Asp Asn Asp Ala Ile Ala Lys Ala Asp Ser Asp Ala Lys Trp Ser
 275 280 285
 Phe Phe Asp Pro Leu Ile Lys Gly Asp Lys Ser Leu Gly Ile Asn Gly
 290 295 300
 Asn Lys Leu Asp Trp Ile Gly Ile Asn Tyr Tyr Thr Arg Thr Met Leu
 305 310 315 320
 Arg Lys Asp Gly Asp Gly Tyr Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Gly His Ser
 325 330 335
 Gly Ser Pro Asn Thr Val Thr Asn Asp Lys Arg Pro Thr Ser Asp Ile
 340 345 350
 Gly Trp Glu Phe Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Tyr Val Ile Met Asn Tyr
 355 360 365
 Trp Asn Arg Tyr Lys Leu Pro Met Tyr Val Thr Glu Asn Gly Ile Ala
 370 375 380
 Asp Asn Gly Asp Tyr Gln Arg Pro Tyr Tyr Leu Val Ser His Ile Ala
 385 390 395 400
 Ser Val Leu Arg Ala Ile Asn Lys Gly Ala Asn Val Lys Gly Tyr Leu
 405 410 415
 His Trp Ser Leu Val Asp Asn Tyr Glu Trp Ala Leu Gly Phe Ser Pro
 420 425 430
 Lys Phe Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Glu Asn Lys Lys Leu Tyr Trp Arg
 435 440 445
 Pro Ser Ala Leu Val Tyr Lys Glu Ile Ala Thr Lys Asn Cys Ile Ser

ES 2 544 710 T3

450 455 460

Pro Glu Leu Lys His Leu Asp Ser Ile Pro Pro Ile Asn Gly Leu Arg
465 470 475 480

Lys

<210> 19
<211> 1404
<212> ADN
<213> *Fervidobacterium nodosum*

<400> 19

atgatgtttc cgaaagattt tttatttggg gtttcgatgt ctggggtttca gtttgagatg	60
ggaaatcctc aagatgcaga agaggttgat ctaaatacag attggtatgt atgggttagg	120
gatattggaa atattgtaaa tggagtcgta agtggggact tgcctgaaaa tggttcatgg	180
tactggaagc agtacggcaa agtccaccaa ttagctgccg attttgggat ggatgtaata	240
cgaattggaa ccgaatgggc taggattttc ccagttagta cgcaaagtgt tgagtacggc	300
tcaccggata tgctcgaaaa attggataaa ttagcaaacc aaaaagcggg aagtcattac	360
aggaaaataa tggaggatat aaaagcaaag ggggttaaaat tgttcgttaa cctttaccac	420
tttactttac ctatttgggt gcacgacct atagctgttc acaaaggtga gaagacagat	480
aaaattgggt ggatttctga tgctacacct attgagtttg cgaagtatgc agagtacatg	540
gcgtggaaat ttgccgatat agttgatatg tgggcttcta tgaacgaacc acacgttgta	600
agtcagcttg gatattttgc aataaatgcg ggatttccac caagttattt taatccttca	660
tggtatatca aaagtttaga aaacgaagcg aaagcacata acttatctta tgatgctata	720
aaaaagtata caaataatcc tgttggagtt atatactctt ttacatggta cgatactgtt	780
aataaagatg acaaggaatc ttttgaaaat gctatggatc tcacaaattg gcgatttata	840
gatatggtaa aagataaaac tgattacata ggtgtaaatt attacacaag agcggttatc	900
gatagacttc ccaccactat tgactttggc gaatttaaaa tgaattggta tactttgaga	960
ggttacgggt attcttgcca agaaggagga ttctcactct ccggaaggcc ggcaagcgaa	1020
tttggatggg aaatataccc tgaagggtcg tacaatattt tgatacatgt ttataataga	1080
tacaaaaaag atatttatgt tacggagaac ggtatagctg attcgaagga taaatacaga	1140
agtcttttta tcatatcgca tctttatgct atagaaaaag cattaaacga aggaatacca	1200
ataaaagggt atttgactg gtcgattata gacaatttcg aatgggcgaa gggctacagt	1260
aaaagatttg gacttgctta cacagatttg tcaacaaaa aatatatacc tagaccttct	1320
atgtacattt ttagagagat aataaaggat aaatcaatcg acaaattcaa aggttacgat	1380
ccatataact tgatgaaatt ctga	1404

<210> 20

<211> 467

<212> PRT

<213> Fervidobacterium nodosum

<400> 20

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

225		230		235		240
Lys Lys Tyr Thr	Asn Asn Pro Val Gly Val	Ile Tyr Ser Phe Thr Trp				
	245	250				255
Tyr Asp Thr Val	Asn Lys Asp Asp Lys Glu Ser Phe Glu Asn Ala Met					
	260	265				270
Asp Leu Thr Asn Trp Arg Phe	Ile Asp Met Val Lys Asp Lys Thr Asp					
	275	280				285
Tyr Ile Gly Val Asn Tyr Tyr Thr Arg Ala Val	Ile Asp Arg Leu Pro					
	290	295				300
Thr Thr Ile Asp Phe Gly Glu Phe Lys Met	Asn Trp Tyr Thr Leu Arg					
	305	310				315
Gly Tyr Gly Tyr Ser Cys Glu Glu Gly Gly Phe Ser Leu Ser Gly Arg						
	325	330				335
Pro Ala Ser Glu Phe Gly Trp Glu Ile Tyr Pro Glu Gly Leu Tyr Asn						
	340	345				350
Ile Leu Ile His Val Tyr Asn Arg Tyr Lys Lys Asp	Ile Tyr Val Thr					
	355	360				365
Glu Asn Gly Ile Ala Asp Ser Lys Asp Lys Tyr Arg Ser Leu Phe Ile						
	370	375				380
Ile Ser His Leu Tyr Ala Ile Glu Lys Ala Leu Asn Glu Gly Ile Pro						
	385	390				395
Ile Lys Gly Tyr Leu His Trp Ser Ile Ile Asp Asn Phe Glu Trp Ala						
	405	410				415
Lys Gly Tyr Ser Lys Arg Phe Gly Leu Ala Tyr Thr Asp Leu Ser Thr						
	420	425				430
Lys Lys Tyr Ile Pro Arg Pro Ser Met Tyr Ile Phe Arg Glu Ile Ile						
	435	440				445
Lys Asp Lys Ser Ile Asp Lys Phe Lys Gly Tyr Asp Pro Tyr Asn Leu						
	450	455				460
Met Lys Phe						
465						

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

<220>
<223> cebador

<400> 21
ccacatattg gcacctctat aagcaagatc atg

<210> 22
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 22
catgatcttg cttagtcggt ttccaatatg ctgg

<210> 23
<211> 1446
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Thermosphaera aggregans

<400> 23

atgggtaaat tccccaaaga cttcatgata ggctactcat cttcaccgtt tcaatttgaa	60
gctggtattc cggggtccga agatccgaat agtgattggt gggatatgggt gcatgatccg	120
gagaacacag cagctggact agtcagcggc gattttcccg agaacggccc aggttactgg	180
aatttaaacc aaaatgacca cgacctgggt gagaagctgg gggttaacac tattagagta	240
ggcgttgagt ggagtaggat ttttccaaag ccaactttca atgttaaagt ccctgtagag	300
agagatgaga acggcagcat tggtcacgta gatgtcgatg ataaagcgggt tgaaagactt	360
gatgaattag ccaacaagga ggccgtaaac cattacgtag aaatgtataa agactggggt	420
gaaagaggta gaaaacttat actcaattta taccattggc ccctgcctct ctggcttcac	480
aacccaatca tggtgagaag aatgggcccg gacagagcgc cctcaggctg gcttaacgag	540
gagtcctggg tggagtttgc caaatacgcc gcatacattg cttggaaaat gggcgagcta	600
cctgttatgt ggagcaccat gaacgaaccc aacgtcgttt atgagcaagg atacatgttc	660
gttaaagggg gtttcccacc cggctacttg agtttggaag ctgctgataa ggccaggaga	720
aatatgatcc aggctcatgc acgggcctat gacaatatta aacgcttcag taagaaacct	780
gttgactaa tatacgcttt ccaatggttc gaactattag aggggtccagc agaagtattt	840
gataagttta agagctctaa gttatactat ttcacagaca tagtatcgaa gggtagttca	900
atcatcaatg ttgaatacag gagagatctt gccaataggc tagactgggtt gggcgtaac	960
tactatagcc gtttagtcta caaaatcgtc gatgacaaac ctataatcct gcacgggtat	1020
ggattccttt gtacacctgg ggggatcagc cgggctgaaa atccttgtag cgattttggg	1080
tgggaggtgt atcctgaagg actctaccta cttctaaaag aactttacaa ccgatacggg	1140
gtagacttga tcgtgaccga gaacgggtgtt tcagacagca gggatgcgtt gagaccggca	1200
tacctggtct cgcattgtta cagcgtatgg aaagccgcta acgagggcat tcccgtaaaa	1260
ggctacctcc actggagctt gacagacaat tacgagtggg cccagggctt caggcagaaa	1320
ttcggtttag tcatggttga cttcaaaact aagaaaagggt atctccgccc aagcgcctta	1380
gtgttccggg agatcgcaac gcataacgga ataccggatg agctacagca tcttacactg	1440
atccag	1446

<210> 24

<211> 482

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Thermosphaera aggregans

<400> 24

ES 2 544 710 T3

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

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

Ile Pro Val Lys Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn Tyr Glu
420 425 430

Trp Ala Gln Gly Phe Arg Gln Lys Phe Gly Leu Val Met Val Asp Phe
435 440 445

Lys Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Arg Glu
450 455 460

Ile Ala Thr His Asn Gly Ile Pro Asp Glu Leu Gln His Leu Thr Leu
465 470 475 480

Ile Gln

<210> 25

<211> 1461

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Caldivirga maquilingensis

<400> 25

atgggtatta agttcccaag cgacttcaga ttgggcttct ccacagtggg tactcagcat	60
gagatgggta cccctgggtc tgaatttgta agtgactggg atgtgtggct tcatgaccct	120
gagaacattg cttcgggctt agttagcggg gatttacctg aacatgggac aggttactgg	180
gacttgata agcaggacca ctcaatagct agggatcttg ggcttgatgc agcatggata	240
actattgagt gggctagggt gttccctaag ccgacctttg acgttaagggt taagggtgat	300
gaggatgatg gaggtaacgt ggttgacgtt gaggttaatg aatcagcatt agaggagtta	360
cgcaggctag ctgacttaaa tgctgttaat cactataggg ggattttaag tgattggaag	420
gagaggggtg gtttactggg gattaacctt taccactggg ctatgcctac gtggcttcat	480
gacccaatag ccgttaggaa gaatggacct gatagagccc cctccggttg gcttgataag	540
agatccgtta ttgagttcac taagtgcga gccttcatag cccatgagtt aggtgactta	600
gctgacatgt ggtatacgat gaatgaacct ggggtagtga taactgaggg ttacctttac	660
gttaagtcag gcttcccacc aggttacctg gacttaaact ccctagccac tgcgggtaag	720
catttaattg aggctcatgc cagagcctac gacgccatta aagcctactc aaggaaacca	780
gtgggcctag tctactcctt cgcagactat cagccgctta ggcagggtga tgaggaggct	840
gttaaggagg ctaagggact tgactactca ttcttcgacg ctccaattaa ggggtgaatta	900
atgggggtta ctagggatga cttgaagggt aggcttgact ggattggggg aaactactac	960
actagggccg tattgaggag gaggcaggat gctggtcggg catcagtagc cgtggtggat	1020
ggattcggct actcctgtga acctggaggc gtatctaattg ataggagacc atgcagtgac	1080
ttcggctggg aatatataccc tgagggtgtt tacaatgtct taatggacct atggaggagg	1140
tataggatgc ccatgtacat cactgagaac ggtatagctg atgagcatga taagtggagg	1200
tcatggttca tagtatcgca cctgtatcaa attcacaggg caatggagga gggggtggat	1260
gtagagggt acttccactg gaacctata gataacttgg agtgggctgc aggatatagg	1320
atgaggttcg gcctagttta cgttgactat gcaaccaaga ggaggatttt taggccaagc	1380
gccctgggta tgaggggagg ggctaaacag aaggctatac cggattactt agagcattac	1440
attaaaccac ctagaattga a	1461

<210> 26

<211> 487

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Caldivirga maquilingensis

<400> 26

ES 2 544 710 T3

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

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

Glu Gly Val Asp Val Arg Gly Tyr Phe His Trp Asn Leu Ile Asp Asn
420 425 430

Leu Glu Trp Ala Ala Gly Tyr Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val
435 440 445

Asp Tyr Ala Thr Lys Arg Arg Tyr Phe Arg Pro Ser Ala Leu Val Met
450 455 460

Arg Glu Val Ala Lys Gln Lys Ala Ile Pro Asp Tyr Leu Glu His Tyr
465 470 475 480

Ile Lys Pro Pro Arg Ile Glu
485

<210> 27

<211> 1476

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 27

atgggtttat cattcccaaa gggtttcaaa tttggctggt ctcagtcggg attccagtct	60
gaaatgggaa ctccaggtag cgaagatccg aacagcgatt ggcacgtctg ggttcattgac	120
agggagaaca tagtctcaca ggttgtcagt ggagatttac ccgaaaatgg tccagggtac	180
tgggggaact ataagagatt tcatgacgaa gcagagaaaa taggactaaa tgcagtgaga	240
attaacgtag agtggagtag aatatttccc agaccactac ccaagcctga aatgcaaaca	300
gggactgata aagagaacag tcctgtcatt agcgtagact taaatgagtc taagctgaga	360
gaaatggaca actacgctaa tcatgaagcg ttatcacatt acaggcaaact actggaggat	420
ctaagaaaca gaggatttca catagtactg aacatgtatc attggacttt gcccatatgg	480
ttgcacgacc ctatcagagt gaggagagga gactttacag gaccaacagg ttggttaaac	540
tccaggacag tttatgagtt cgctaggttc tcggcttacg tagcctggaa attagatgat	600
ttggcgagtg aatatgcaac aatgaatgaa cctaacgtgg tttggggagc aggttacgct	660
tttcctagag caggctttcc acctaattac cttagcttca ggctttcaga aatagctaaa	720
tggaatataa ttcagggtca tgcgagggtt tatgacgcca tcaagagcgt atcaaaaaag	780
agtgtaggta taatatatgc aaacacatca tattaccacac tcagaccaca agataacgaa	840
gctgtggaaa tagcagagag attgaacaga tggagtttct ttgactccat tataaaggga	900
gagataacta gtgagggaca aaatgtcaga gaggacttaa ggaacagggt agactggatt	960
ggcgtaaact attacacgag gactgtggta acaaaagctg agagtgggta tttaacctt	1020
ccgggttatg gagatcggtg tgaaaggaac tcattgagtt tagctaacct ccctaccagt	1080
gatttcggtt gggagttctt tcctgagggt ctatatgatg tacttttgaa gtattggaat	1140
aggatatgggt taccattata cgtaatggag aacggtatcg ctgatgacgc tgactaccaa	1200
agaccgtatt acttagtatc acatatctac cagggtgcaca gggctttaa cgaggagta	1260
gatgtaagag gttatcttca ttggtctttg gcagataatt atgagtggtc gtcaggtttt	1320
tcaatgaggt tcggtctact taaggtagat tatctaaca agagattgta ctggagacct	1380
tctgcattag tttacaggga gattactagg agtaacggta ttcctgagga gctggaacat	1440
ctaaacagag taccaccaat aaaacctttg agacat	1476

<210> 28

<211> 492

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sulfolobus acidocaldarius

<400> 28

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

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

ES 2 544 710 T3

420					425					430					
Asn	Tyr	Glu	Trp	Ser	Ser	Gly	Phe	Ser	Met	Arg	Phe	Gly	Leu	Leu	Lys
		435					440					445			
Val	Asp	Tyr	Leu	Thr	Lys	Arg	Leu	Tyr	Trp	Arg	Pro	Ser	Ala	Leu	Val
	450					455					460				
Tyr	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Ser	Asn	Gly	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	His
465					470					475					480
Leu	Asn	Arg	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Pro	Leu	Arg	His				
				485					490						

<210> 29
<211> 1470
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sulfolobus solfataricus

<400> 29

atgggttact catttccaaa tagctttagg tttggttggt cccaggccgg atttcaatca	60
gaaatgggaa caccagggtc agaagatcca aatactgact ggtataaatg ggttcatgat	120
ccagaaaaca tggcagcggg attagtaagt ggagatctac cagaaaatgg gccaggctac	180
tggggaaaact ataagacatt tcacgataat gcacaaaaaa tgggattaaa aatagctaga	240
ctaaatgtgg aatggtctag gatatttcct aatccattac caaggccaca aaactttgat	300
gaatcaaaac aagatgtgac agaggttgag ataaacgaaa acgagttaaa gagacttgac	360
gagtacgcta ataaagacgc attaaacat tacagggaaa tattcaagga tcttaaaagt	420
agaggacttt actttatact aaacatgtat cattggccat tacctctatg gttacacgac	480
ccaataagag taagaagagg agattttact ggaccaagtg gttggctaag tactagaaca	540
gtttacgagt tcgctagatt ctacgcttat atagcttgga aattcgatga tctagtggat	600
gagtactcaa caatgaatga acctaacggt gttggagggt taggatacgt tgggtgtaag	660
tccggttttc ccccaggata cctaagcttt gaactttccc gtagggcaat gtataacatc	720
attcaagctc acgcaagagc gtatgatggg ataaagagtg tttctaaaaa accagttgga	780
attattttacg ctaatagctc attccagccg ttaacggata aagatatgga agcggtagag	840
atggctgaaa atgataatag atggtggttc tttgatgcta taataagagg tgagatcacc	900
agaggaaacg agaagattgt aagagatgac ctaaagggtg gattggattg gattggaggt	960
aattattaca ctaggactgt tgtgaagagg actgaaaagg gatacgttag cttaggaggt	1020
tacggtcacg gatgtgagag gaactctgta agtttagcgg gattaccaac cagcgacttc	1080
ggctgggagt tcttcccaga aggtttatat gacgttttga cgaaatactg gaatagatat	1140
catctctata tgtacgttac tgaaaatggt attgcggatg atgccgatta tcaaaggccc	1200
tattatttag tatctcacgt ttatcaagtt catagagcaa taaatagtgg tgcagatgtt	1260
agagggtatt tacattggtc tctagctgat aattacgaat gggcttcagg attctctatg	1320
aggtttggtc tgttaaaggc cgattacaac actaagagac tatactggag accctcagca	1380
ctagtatata gggaaatcgc cacaaatggc gcaataactg atgaaataga gcacttaaat	1440
agcgtacctc cagtaaagcc attaaggcac	1470

<210> 30

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sulfolobus solfataricus

<400> 30

Met Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Ser Phe Arg Phe Gly Trp Ser Gln Ala
1 5 10 15

Gly Phe Gln Ser Glu Met Gly Thr Pro Gly Ser Glu Asp Pro Asn Thr
20 25 30

Asp Trp Tyr Lys Trp Val His Asp Pro Glu Asn Met Ala Ala Gly Leu
35 40 45

Val Ser Gly Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Gly Tyr Trp Gly Asn Tyr
50 55 60

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

Leu Asn Val Glu Trp Ser Arg Ile Phe Pro Asn Pro Leu Pro Arg Pro
85 90 95

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

Glu Asn Glu Leu Lys Arg Leu Asp Glu Tyr Ala Asn Lys Asp Ala Leu
115 120 125

Asn His Tyr Arg Glu Ile Phe Lys Asp Leu Lys Ser Arg Gly Leu Tyr
130 135 140

Phe Ile Leu Asn Met Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Leu His Asp
145 150 155 160

Pro Ile Arg Val Arg Arg Gly Asp Phe Thr Gly Pro Ser Gly Trp Leu

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

Glu Trp Ala Ser Gly Phe Ser Met Arg Phe Gly Leu Leu Lys Val Asp
 435 440 445

Tyr Asn Thr Lys Arg Leu Tyr Trp Arg Pro Ser Ala Leu Val Tyr Arg
 450 455 460

Glu Ile Ala Thr Asn Gly Ala Ile Thr Asp Glu Ile Glu His Leu Asn
 465 470 475 480

Ser Val Pro Pro Val Lys Pro Leu Arg His
 485 490

<210> 31

<211> 1488

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> *Picrophilus torridus*

<400> 31

atggggtttac ccaagaactt tttacttggc ttttctcttg ctggccttca gtctgaaatg	60
ggcatatcag atcctgatag caattcagat tgggtggttat gggtagatga cccggtgaat	120
ataaggactg gacttgtatc tgggtgactta cctgaaaatg gaataggata ctgggatctt	180
tacaaaaaat ataatggtct ggctgttcaa acaggaatga atgctgcaag gcttggagtt	240
gaatggagca ggatatttcc aaaaagtact gaagaagtaa aggtgatgga agattacaaa	300
gatgatgatt taatttccgt ggatgttaat gaggggaagtc ttgaaaaact tgacagactg	360
gcaaatcaaa aggcaattaa tagatatatg gaaatcttca ataatatcaa ggaaaataat	420
atgacgctaa tagtgaatgt ttaccattgg ccaataccaa tataatcttca cgatccaata	480
gaagctagga atagtggact ttcaaataaa agaaatggct ggcttaatca taaaaccggt	540
gtggaatttg taaaatatgc aaaatatctg gcatggaaat ttagcgatgt ggcagatatg	600
ttttctataa tgaatgagcc aaacgttgta tttggtaatg gatattttta tggtaaatca	660
gggttcccac cagcatttcc aagtgtgcat ggcgggttgc ttgcaaaaaa acatgaaatt	720
gaggctatag caagatcata cgacgccatg aaggagatta caaaaaaacc agttggtcta	780
attatggcaa attcagatgt acaaccacta acagatgagg ataaagaagc agcagaaatg	840
gctacttaca atgatcgcta ttcattcata gatccgctaa gagttggtga gatgaaatgg	900
gctgatgagg ttactgcagg taatccaatt ggtgaaaaga gcaacatcga tagatctgat	960
ctaaaaaata agctagactg gataggtgtt aactattata caagggccgt tgtaaaaaaa	1020
tctggaaacg gatatacaac attaaaagga tatggacact ctgcaaccgc tggcatgcca	1080
agtagggccg gaagggatgt aagtgacttt ggctgggaat tttatccaga aggtcttgta	1140
aacgtcttat catcactctg gaaaagatat cacattccaa tgattgtgac tgaaaatgg	1200
gttgctgact ctattgatag acttagacca aggtaccttg tgtcacatat aaagtctgtt	1260
gaaaaggctt tatctatggg tatggatatt aggggatatc ttcactggtc tctgattgat	1320
aactatgaat gggcatcagg tttttcaatg aaatttgggc tttatggtat tgatttgaac	1380
aataaaaaaga ttcaacacag accaagtgca ctggtattta aagaaattgc aaatgccaac	1440
ggagtcgccg aggaatttga atggatggca gaccagcatc agaactca	1488

<210> 32
 <211> 496
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> *Picrophilus torridus*
 <400> 32

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

His Lys Thr Val Val Glu Phe Val Lys Tyr Ala Lys Tyr Leu Ala Trp
180 185 190

Lys Phe Ser Asp Val Ala Asp Met Phe Ser Ile Met Asn Glu Pro Asn
195 200 205

Val Val Phe Gly Asn Gly Tyr Phe Asn Val Lys Ser Gly Phe Pro Pro
210 215 220

Ala Phe Pro Ser Val His Gly Gly Leu Leu Ala Lys Lys His Glu Ile
225 230 235 240

Glu Ala Ile Ala Arg Ser Tyr Asp Ala Met Lys Glu Ile Thr Lys Lys
245 250 255

Pro Val Gly Leu Ile Met Ala Asn Ser Asp Val Gln Pro Leu Thr Asp
260 265 270

Glu Asp Lys Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Tyr Asn Asp Arg Tyr Ser
275 280 285

Phe Ile Asp Pro Leu Arg Val Gly Glu Met Lys Trp Ala Asp Glu Val
290 295 300

Thr Ala Gly Asn Pro Ile Gly Glu Lys Ser Asn Ile Asp Arg Ser Asp
305 310 315 320

Leu Lys Asn Lys Leu Asp Trp Ile Gly Val Asn Tyr Tyr Thr Arg Ala
325 330 335

Val Val Lys Lys Ser Gly Asn Gly Tyr Thr Thr Leu Lys Gly Tyr Gly
340 345 350

His Ser Ala Thr Ala Gly Met Pro Ser Arg Ala Gly Arg Asp Val Ser
355 360 365

Asp Phe Gly Trp Glu Phe Tyr Pro Glu Gly Leu Val Asn Val Leu Ser
370 375 380

Ser Tyr Trp Lys Arg Tyr His Ile Pro Met Ile Val Thr Glu Asn Gly
385 390 395 400

Val Ala Asp Ser Ile Asp Arg Leu Arg Pro Arg Tyr Leu Val Ser His
405 410 415

Ile Lys Ser Val Glu Lys Ala Leu Ser Met Gly Met Asp Ile Arg Gly
420 425 430

Tyr Leu His Trp Ser Leu Ile Asp Asn Tyr Glu Trp Ala Ser Gly Phe
435 440 445

Ser Met Lys Phe Gly Leu Tyr Gly Ile Asp Leu Asn Asn Lys Lys Ile
450 455 460

Gln His Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Lys Glu Ile Ala Asn Ala Asn
465 470 475 480

Gly Val Pro Glu Glu Phe Glu Trp Met Ala Asp Gln His Gln Asn Ser
485 490 495

<210> 33

<211> 1443

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Thermoplasma volcanium

<400> 33

atggtagaaa	acaattttcc	agaggatttc	aaatttggtt	ggtcacagtc	aggttttcaa	60
tccgagatgg	gctatgataa	cgcaatggac	gataaaagtg	actggtatgt	ctgggttcat	120
gataaagaaa	acatccaatc	agggtttgta	agcggagaca	tgcccgaaaa	tgggtccgggt	180
tactggaata	actataaatc	attccatgaa	gctgcacaga	atatgggatt	aaaaatggca	240
agaatcggag	ttgaatggtc	aagattattc	ccggaacctt	tcccggaaaa	aataatggca	300
gatgcaaaaa	ataattcctt	agaaataaac	aataacattc	tttcagaact	tgataaatat	360
gtcaataaag	atgcactcaa	ccattacatt	gagatattta	atgatatcaa	aaatagaaat	420
atagatttaa	taattaatat	gtaccactgg	ccacttcctg	tatggctaag	cgatcctgta	480
tctgttagaa	aaggaataaa	aacagaaaga	tcaggctggc	tgaatgacag	gatagttcaa	540
ttgtttgctt	tattctcctc	gtatatagta	tataaaatgg	aagatctggc	agttgcattt	600
tcaaccatga	atgaacctaa	tgttgtttat	ggaaatgggt	ttataaatat	caaatcaggt	660
tttccgcctt	cctatctcag	ttcagaatth	gcatctaaag	ttaagaacaa	tatattaaaa	720
gcacattctc	ttgcatacga	ttctatgaaa	aaaattacgg	ataaacctgt	gggaataatt	780
tatgcaaaca	catattttac	gcctttggac	ccggaaaaag	ataatgatgc	tattgctaaa	840
gcagacagtg	atgcgaaatg	gtcatttttt	gatccattaa	taaaaggaga	taaatcactt	900
ggaattaatg	gcaataaact	agattggatc	ggaattaatt	attatacaag	gacaatgtta	960
aggaaagacg	gagatggcta	tatttcatta	aaaggctatg	gtcattcagg	ttctcctaatt	1020
actgtaacaa	acgataaaaag	accaacaagt	gatataggat	gggaatttta	tccggagggga	1080
ttggaatatg	taattatgaa	ttactggaac	aggtataaat	tgcctatgta	cgtaacagaa	1140
aatggcatag	ccgataatgg	ggattatcag	aggccttatt	atttagtttc	acacattgca	1200
agtgtactga	gggcaataaaa	taaaggagcc	aatgtaaagg	gttatttgca	ctggctctta	1260
gttgataaatt	atgaatgggc	attgggattt	agcccgaaat	ttggtttaatt	aggatacgat	1320
gaaaataaaa	aactatactg	gaggccaagt	gctcttggtt	ataaggaaat	agcaacaaaa	1380
aattgcatat	ccccagaatt	aaagcacctc	gattcaatac	cgcctataaa	tggtttaaga	1440
aaa						1443

<210> 34
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Thermoplasma volcanium

<400> 34

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

Arg Ile Val Gln Leu Phe Ala Leu Phe Ser Ser Tyr Ile Val Tyr Lys
 180 185 190

Met Glu Asp Leu Ala Val Ala Phe Ser Thr Met Asn Glu Pro Asn Val
 195 200 205

Val Tyr Gly Asn Gly Phe Ile Asn Ile Lys Ser Gly Phe Pro Pro Ser
 210 215 220

Tyr Leu Ser Ser Glu Phe Ala Ser Lys Val Lys Asn Asn Ile Leu Lys
 225 230 235 240

Ala His Ser Leu Ala Tyr Asp Ser Met Lys Lys Ile Thr Asp Lys Pro
 245 250 255

Val Gly Ile Ile Tyr Ala Asn Thr Tyr Phe Thr Pro Leu Asp Pro Glu
 260 265 270

Lys Asp Asn Asp Ala Ile Ala Lys Ala Asp Ser Asp Ala Lys Trp Ser
 275 280 285

Phe Phe Asp Pro Leu Ile Lys Gly Asp Lys Ser Leu Gly Ile Asn Gly
 290 295 300

Asn Lys Leu Asp Trp Ile Gly Ile Asn Tyr Tyr Thr Arg Thr Met Leu
 305 310 315 320

Arg Lys Asp Gly Asp Gly Tyr Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Gly His Ser
 325 330 335

Gly Ser Pro Asn Thr Val Thr Asn Asp Lys Arg Pro Thr Ser Asp Ile
 340 345 350

Gly Trp Glu Phe Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Tyr Val Ile Met Asn Tyr
 355 360 365

Trp Asn Arg Tyr Lys Leu Pro Met Tyr Val Thr Glu Asn Gly Ile Ala
 370 375 380

Asp Asn Gly Asp Tyr Gln Arg Pro Tyr Tyr Leu Val Ser His Ile Ala
 385 390 395 400

Ser Val Leu Arg Ala Ile Asn Lys Gly Ala Asn Val Lys Gly Tyr Leu
 405 410 415

His Trp Ser Leu Val Asp Asn Tyr Glu Trp Ala Leu Gly Phe Ser Pro
 420 425 430

Lys Phe Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Glu Asn Lys Lys Leu Tyr Trp Arg
 435 440 445

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

Pro Glu Leu Lys His Leu Asp Ser Ile Pro Pro Ile Asn Gly Leu Arg
 465 470 475 480

Lys

<210> 35

<211> 1404

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fervidobacterium nodosum

<400> 35

atgggtatgt ttccgaaaga ttttttattt ggtgtttcga tgtctgggtt tcagtttgag	60
atgggaaatc ctcaagatgc agaagaggtt gatctaaata cagattggta tgtatgggtt	120
agggatattg gaaatattgt aaatggagtc gtaagtgggg acttgcctga aaatggttca	180
tggtactgga agcagtacgg caaagtccac caattagctg ccgattttgg gatggatgta	240
atacgaattg gaaccgaatg gtctaggatt ttcccagtta gtacgcaaag tgttgagtac	300
ggctcaccgg atatgctcga aaaattggat aaattagcaa accaaaaagc ggtaagtcac	360
tacaggaaaa taatggagga tataaaagca aaggggttaa aattgttcgt taacctttac	420
cactttactt tacctatttg gttgcacgac cctatagctg ttcacaaagg tgagaagaca	480
gataaaattg gttggatttc tgatgctaca cctattgagt ttgcgaagta tgcagagtac	540
atggcgtgga aatttgccga tatagttgat atgtgggctt ctatgaacga accacacgtt	600
gtaagtcagc ttggatattt tgcaataaat gcgggatttc caccaagtta ttttaatcct	660
tcattggtata tcaaaagttt agaaaacgaa gcgaaagcac ataacttatc ttatgatgct	720
ataaaaaagt atacaaataa tcctgttgga gttatatact cttttacatg gtacgatact	780
gttaataaag atgacaagga atcttttgaa aatgctatgg atctcacaaa ttggcgattt	840
atagatatgg taaaagataa aactgattac ataggtgtaa attattacac aagagcgggt	900
atcgatagac ttcccaccac tattgacttt ggcgaaattt aaatgaattg gtatactttg	960
agaggttacg gttattcttg cgaagaagga ggattctcac tctccggaag gccggcaagc	1020
gaatttggtat gggaaatata ccctgaaggg ctgtacaata ttttgataca tgtttataat	1080
agatacaaaa aagatattta tgttacggag aacgggtatag ctgattcgaa ggataaatac	1140
agaagtcttt ttatcatatc gcatctttat gctatagaaa aagcattaaa cgaaggaata	1200
ccaataaaaag gttatttgca ctggtcgatt atagacaatt tcgaatgggc gaagggctac	1260
agtaaaagat ttggacttgc ttacacagat ttgtcaacca aaaaatatat acctagacct	1320
tctatgtaca tttttagaga gataataaag gataaatcaa tcgacaaatt caaaggttac	1380
gatccatata acttgatgaa attc	1404

<210> 36

<211> 468

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Fervidobacterium nodosum

<400> 36

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

Ala Ser Met Asn Glu Pro His Val Val Ser Gln Leu Gly Tyr Phe Ala
195 200 205

Ile Asn Ala Gly Phe Pro Pro Ser Tyr Phe Asn Pro Ser Trp Tyr Ile
210 215 220

Lys Ser Leu Glu Asn Glu Ala Lys Ala His Asn Leu Ser Tyr Asp Ala
225 230 235 240

Ile Lys Lys Tyr Thr Asn Asn Pro Val Gly Val Ile Tyr Ser Phe Thr
245 250 255

Trp Tyr Asp Thr Val Asn Lys Asp Asp Lys Glu Ser Phe Glu Asn Ala
260 265 270

Met Asp Leu Thr Asn Trp Arg Phe Ile Asp Met Val Lys Asp Lys Thr
275 280 285

Asp Tyr Ile Gly Val Asn Tyr Tyr Thr Arg Ala Val Ile Asp Arg Leu
290 295 300

Pro Thr Thr Ile Asp Phe Gly Glu Phe Lys Met Asn Trp Tyr Thr Leu
305 310 315 320

Arg Gly Tyr Gly Tyr Ser Cys Glu Glu Gly Gly Phe Ser Leu Ser Gly
325 330 335

Arg Pro Ala Ser Glu Phe Gly Trp Glu Ile Tyr Pro Glu Gly Leu Tyr
340 345 350

Asn Ile Leu Ile His Val Tyr Asn Arg Tyr Lys Lys Asp Ile Tyr Val
355 360 365

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

Ile Ile Ser His Leu Tyr Ala Ile Glu Lys Ala Leu Asn Glu Gly Ile
385 390 395 400

Pro Ile Lys Gly Tyr Leu His Trp Ser Ile Ile Asp Asn Phe Glu Trp
405 410 415

Ala Lys Gly Tyr Ser Lys Arg Phe Gly Leu Ala Tyr Thr Asp Leu Ser
420 425 430

Thr Lys Lys Tyr Ile Pro Arg Pro Ser Met Tyr Ile Phe Arg Glu Ile
435 440 445

Ile Lys Asp Lys Ser Ile Asp Lys Phe Lys Gly Tyr Asp Pro Tyr Asn
 450 455 460

Leu Met Lys Phe
 465

<210> 37

<211> 1446

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-glucosidasa mutante de Thermosphaera aggregans que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 37

atgggtaaat tccccaaaga cttcatgata ggctactcat cttcaccgtt tcaatttgaa	60
gctgggtattc ccgggtccga agatccgaat agtgattggt ggggtatgggt gcatgatccg	120
gagaacacag cagctggact agtcagcggc gattttcccg agaacggccc aggttactgg	180
aaccgcactc aaaatgacca cgacctggct gagaagctgg gggttaacac tattagagta	240
ggcggttgagt ggagtaggat ttttccaaag ccaactttca atgttaaagt ccctgtagag	300
agagatgaga acggcagcat tggtcacgta gatgtcgatg ataaagcgggt tgaaagactt	360
gatgaattag ccaacaagga ggccgtaaac cattacgtag aaatgtataa agactggggt	420
gaaagaggta gaaaacttat actcaattta taccattggc ccctgcctct ctggcttcac	480
aacccaatca tggtgagaag aatgggcccg gacagagcgc cctcaggctg gcttaacgag	540
gagtcctgtg tggagtittgc caaatacgcc gcatacattg cttggaaaat gggcgagcta	600
cctgttatgt ggagcaccat gaacgaaccc aacgtcgttt atgagcaagg atacatgttc	660
gttaaagggg gtttcccacc cggctacttg agtttggaag ctgctgataa ggccaggaga	720
aatatgatcc aggctcatgc acgggcctat gacaatatta aacgcttcag taagaaacct	780
gttggaactaa tatacgtttt ccaatggttc gaactattag aggggtccagc agaagtattt	840
gataagttta agagctctaa gttatactat ttcacagaca tagtatcgaa gggtagttca	900
atcatcaatg ttgaatacag gagagatctt gccaataggc tagactgggt gggcgtaaac	960
tactatagcc gtttagtcta caaaatcgtc gatgacaaac ctataatcct gcacgggtat	1020
ggatttccttt gtacacctgg ggggatcagc ccggctgaaa atccttgtag cgattttggg	1080
tgggaggtgt atcctgaagg actctaccta cttctaaaag aactttacaa ccgatacggg	1140
gtagacttga tcgtgaccga gaacgggtgt tcagacagca gggatgcgtt gagaccggca	1200
tacctggtct cgcagtgtta cagcgtatgg aaagccgcta acgagggcat tcccgtcaaa	1260
ggctacctcc actggagctt gacagacaat tacgagtggg cccagggtt caggcagaaa	1320
ttcggtttag tcatggttga cttcaaaact aagaaaagggt atctccgccc aagcgcccta	1380
 gtgttccggg agatcgcaac gcataacgga ataccggatg agctacagca tcttacactg	1440
atccag	1446

<210> 38

<211> 482

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Beta-glucosidasa mutante de Thermosphaera aggregans que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (61)..(63)

<223>

<400> 38

```

Met Gly Lys Phe Pro Lys Asp Phe Met Ile Gly Tyr Ser Ser Ser Pro
1           5           10           15

Phe Gln Phe Glu Ala Gly Ile Pro Gly Ser Glu Asp Pro Asn Ser Asp
          20           25           30

Trp Trp Val Trp Val His Asp Pro Glu Asn Thr Ala Ala Gly Leu Val
          35           40           45

Ser Gly Asp Phe Pro Glu Asn Gly Pro Gly Tyr Trp Asn Arg Thr Gln
50           55           60

Asn Asp His Asp Leu Ala Glu Lys Leu Gly Val Asn Thr Ile Arg Val
65           70           75           80

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

Val Pro Val Glu Arg Asp Glu Asn Gly Ser Ile Val His Val Asp Val
          100          105          110

Asp Asp Lys Ala Val Glu Arg Leu Asp Glu Leu Ala Asn Lys Glu Ala
          115          120          125

Val Asn His Tyr Val Glu Met Tyr Lys Asp Trp Val Glu Arg Gly Arg
130           135           140

Lys Leu Ile Leu Asn Leu Tyr His Trp Pro Leu Pro Leu Trp Leu His
145           150           155           160

Asn Pro Ile Met Val Arg Arg Met Gly Pro Asp Arg Ala Pro Ser Gly
          165          170          175

```

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

atgggtatta agttcccaag cgacttcaga ttcggtcttct ccacagtggg tactcagcat	60
gagatgggta cccctgggtc tgaatttgta agtgactggg atgtgtggct tcatgaccct	120
gagaacattg cttcgggctt agtttagcgg gatttacctg aacatgggcc aggttactgg	180
aaccgcacta agcaggacca ctcaatagct agggatcttg ggcttgatgc agcatggata	240
actattgagt gggctagggt gttccctaag cgcacctttg acgttaaggt taaggttgat	300
gaggatgatg gaggtaacgt gggtgacgtt gaggttaatg aatcagcatt agaggagtta	360
cgcaggctag ctgacttaaa tgctgttaat cactataggg ggattttaag tgattggaag	420
gagaggggtg gtttactggg gattaacctt taccactggg ctatgcctac gtggcttcat	480
gacccaatag ccgttaggaa gaatggacct gatagagccc cctccggttg gcttgataag	540
agatccgtta ttgagttcac taagttcgca gccttcatag cccatgagtt aggtgactta	600
gctgacatgt ggtatacgat gaatgaacct ggggtagtga taactgaggg ttacctttac	660
gttaagtcag gcttcccacc aggttacctg gacttaaact ccctagccac tgcgggtaag	720
catttaattg aggctcatgc cagagcctac gacgccatta aagcctactc aaggaaacca	780
gtgggcctag tctactcctt cgcagactat cagccgctta ggcaggggtga tgaggaggct	840
gttaaggagg ctaagggact tgactactca ttcttcgacg ctccaattaa ggggtgaatta	900
atgggggtta ctagggatga cttgaagggt aggcttgact ggattggggg aaactactac	960
actagggccg tattgaggag gaggcaggat gctggtcggg catcagtagc cgtggtggat	1020
ggattcggct actcctgtga acctggaggc gtatctaata ataggagacc atgcagtgac	1080
ttcgggctggg aaatataccc tgagggtgtt tacaatgtct taatggacct atggaggagg	1140
tataggatgc ccatgtacat cactgagaac ggtatagctg atgagcatga taagtggagg	1200
tcatggttca tagtatcgca cctgtatcaa attcacaggg caatggagga ggggggtggat	1260
gttagaggggt acttcactg gaaccttaata gataacttgg agtgggctgc aggatatagg	1320
atgaggttcg gcctagttta cggtgactat gcaaccaaga ggaggtatth taggccaagc	1380
gccctgggta tgaggggagg ggctaaacag aaggctatac cggattactt agagcattac	1440
attaaaccac ctagaattga a	1461

<210> 40

<211> 487

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Familia de proteínas glucósido hidrolasa mutante de Caldivirga maquilingensis que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (61)..(63)

<223>

<400> 40

Met Gly Ile Lys Phe Pro Ser Asp Phe Arg Phe Gly Phe Ser Thr Val
 1 5 10 15

Gly Thr Gln His Glu Met Gly Thr Pro Gly Ser Glu Phe Val Ser Asp
 20 25 30

Trp Tyr Val Trp Leu His Asp Pro Glu Asn Ile Ala Ser Gly Leu Val
 35 40 45

Ser Gly Asp Leu Pro Glu His Gly Pro Gly Tyr Trp Asn Arg Thr Lys
 50 55 60

Gln Asp His Ser Ile Ala Arg Asp Leu Gly Leu Asp Ala Ala Trp Ile
 65 70 75 80

Thr Ile Glu Trp Ala Arg Val Phe Pro Lys Pro Thr Phe Asp Val Lys
 85 90 95

Val Lys Val Asp Glu Asp Asp Gly Gly Asn Val Val Asp Val Glu Val
 100 105 110

Asn Glu Ser Ala Leu Glu Glu Leu Arg Arg Leu Ala Asp Leu Asn Ala
 115 120 125

Val Asn His Tyr Arg Gly Ile Leu Ser Asp Trp Lys Glu Arg Gly Gly
 130 135 140

Leu Leu Val Ile Asn Leu Tyr His Trp Ala Met Pro Thr Trp Leu His
 145 150 155 160

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

Glu Gly Val Asp Val Arg Gly Tyr Phe His Trp Asn Leu Ile Asp Asn
420 425 430

Leu Glu Trp Ala Ala Gly Tyr Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val
435 440 445

Asp Tyr Ala Thr Lys Arg Arg Tyr Phe Arg Pro Ser Ala Leu Val Met
450 455 460

Arg Glu Val Ala Lys Gln Lys Ala Ile Pro Asp Tyr Leu Glu His Tyr
465 470 475 480

Ile Lys Pro Pro Arg Ile Glu
485

<210> 41

<211> 1476

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-galactosidasa mutante de Sulfolobus acidocaldarius que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 41

atggggtttat cattcccaaa gggtttcaaa tttggctggt ctcagtcggg attccagtct	60
gaaatgggaa ctccaggtag cgaagatccg aacagcgatt ggcacgtctg ggttcattgac	120
agggagaaca tagtctcaca ggttgctcagt ggagattttac ccgaaaatgg tccagggtac	180
tggaaccgca ctaagagatt tcatgacgaa gcagagaaaa taggactaaa tgcagtgaga	240
attaacgtag agtggagtag aatattttccc agaccactac ccaagcctga aatgcaaaca	300
gggactgata aagagaacag tcctgtcatt agcgtagact taaatgagtc taagctgaga	360
gaaatggaca actacgctaa tcatgaagcg ttatcacatt acaggcaaact actggaggat	420
ctaagaaaca gaggatttca catagtactg aacatgtatc attggacttt gcccatatgg	480
ttgcacgacc ctatcagagt gaggagagga gactttacag gaccaacagg ttgggttaaac	540
tccaggacag tttatgagtt cgctagggtc tcggcttacg tagcctggaa attagatgat	600
ttggcgagtg aatatgcaac aatgaatgaa cctaacgtgg tttggggagc aggttacgct	660
tttcctagag caggctttcc acctaattac cttagcttca ggctttcaga aatagctaaa	720
tggaatataa ttcaggctca tgcgagggct tatgacgcca tcaagagcgt atcaaaaaag	780
agtgtaggta taatatatgc aaacacatca tattaccacac tcagaccaca agataacgaa	840
gctgtggaaa tagcagagag attgaacaga tggagtttct ttgactccat tataaagga	900
gagataacta gtgagggaca aaatgtcaga gaggacttaa ggaacagggt agactggatt	960
ggcgtaaaact attacacgag gactgtggta acaaaagctg agagtggta tttaacctt	1020
ccgggttatg gagatcgttg tgaaaggaac tcattgagtt tagctaacct ccctaccagt	1080
gatttcgggtt gggagtttctt tcctgaggggt ctatatgatg tacttttgaa gtattggaat	1140
aggtatgggt taccattata cgtaatggag aacgggtatcg ctgatgacgc tgactaccaa	1200
agaccgtatt acttagtatc acatatctac cagggtgcaca gggctttaa cgagggagta	1260
gatgtaagag gttatcttca ttggtctttg gcagataatt atgagtggc gtcagggttt	1320
tcaatgaggt tcggtctact taaggtagat tatctaacaa agagattgta ctggagacct	1380
tctgcattag tttacaggga gattactagg agtaacggta ttcctgagga gctggaacat	1440
ctaaacagag taccaccaat aaaacctttg agacat	1476

<210> 42

<211> 492

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Beta-galactosidasa mutante de Sulfolobus acidocaldarius que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (62)..(64)

<223>

<400> 42

Met Gly Leu Ser Phe Pro Lys Gly Phe Lys Phe Gly Trp Ser Gln Ser
1 5 10 15

Gly Phe Gln Ser Glu Met Gly Thr Pro Gly Ser Glu Asp Pro Asn Ser
20 25 30

Asp Trp His Val Trp Val His Asp Arg Glu Asn Ile Val Ser Gln Val
35 40 45

Val Ser Gly Asp Leu Pro Glu Asn Gly Pro Gly Tyr Trp Asn Arg Thr
50 55 60

Lys Arg Phe His Asp Glu Ala Glu Lys Ile Gly Leu Asn Ala Val Arg
65 70 75 80

Ile Asn Val Glu Trp Ser Arg Ile Phe Pro Arg Pro Leu Pro Lys Pro
85 90 95

Glu Met Gln Thr Gly Thr Asp Lys Glu Asn Ser Pro Val Ile Ser Val
100 105 110

Asp Leu Asn Glu Ser Lys Leu Arg Glu Met Asp Asn Tyr Ala Asn His
115 120 125

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

385		390		395		400									
Arg	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Val	Ser	His	Ile	Tyr	Gln	Val	His	Arg	Ala	Leu
				405					410					415	
Asn	Glu	Gly	Val	Asp	Val	Arg	Gly	Tyr	Leu	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Asp
			420					425					430		
Asn	Tyr	Glu	Trp	Ser	Ser	Gly	Phe	Ser	Met	Arg	Phe	Gly	Leu	Leu	Lys
		435					440					445			
Val	Asp	Tyr	Leu	Thr	Lys	Arg	Leu	Tyr	Trp	Arg	Pro	Ser	Ala	Leu	Val
	450					455					460				
Tyr	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Ser	Asn	Gly	Ile	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	His
465					470					475					480
Leu	Asn	Arg	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Pro	Leu	Arg	His				
				485					490						

<210> 43

<211> 1470

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-galactosidasa mutante de Sulfolobus sulfataricus que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 43

atgggttact catttccaaa tagctttagg tttggttggt cccaggccgg atttcaatca	60
gaaatgggaa caccagggtc agaagatcca aatactgact ggtataaatg ggttcatgat	120
ccagaaaaca tggcagcggg attagtaagt ggagatctac cagaaaatgg gccaggctac	180
tggaaccgca ctaagacatt tcacgataat gcacaaaaaa tgggattaaa aatagctaga	240
ctaaatgtgg aatggtctag gatatttcct aatccattac caaggccaca aaactttgat	300
gaatcaaaac aagatgtgac agaggttgag ataaacgaaa acgagttaaa gagacttgac	360
gagtacgcta ataaagacgc attaaacat tacagggaaa tattcaagga tcttaaaagt	420
agaggacttt actttatact aaacatgtat cattggccat tacctctatg gttacacgac	480
ccaataagag taagaagagg agattttact ggaccaagtg gttggctaag tactagaaca	540
gtttacgagt tcgctagatt ctcagcttat atagcttgga aattcgatga tctagtggat	600
gagtactcaa caatgaatga acctaacgtt gttggagggt taggatacgt tgggtgtaag	660
tccggttttc ccccaggata cctaagcttt gaactttccc gtagggcaat gtataacatc	720
attcaagctc acgcaagagc gtatgatggg ataaagagtg tttctaaaaa accagttgga	780
attattttacg ctaatagctc attccagccg ttaacggata aagatatgga agcggtagag	840
atggctgaaa atgataatag atggtggttc tttgatgcta taataagagg tgagatcacc	900
agaggaaacg agaagattgt aagagatgac cttaaagggtta gattggattg gattggagtt	960
aattattaca ctaggactgt tgtgaagagg actgaaaagg gatacgttag cttaggaggt	1020
tacggtcacg gatgtgagag gaactctgta agtttagcgg gattaccaac cagcgacttc	1080
ggctgggagt tcttcccaga aggtttatat gacgttttga cgaaatactg gaatagatat	1140
catctctata tgtacgttac tgaaaatggt attgcggatg atgccgatta tcaaaggccc	1200
tattatttag tatctcacgt ttatcaagtt catagagcaa taaatagtgg tgcagatggt	1260
agagggtatt tacattggtc tctagctgat aattacgaat gggcttcagg attctctatg	1320
aggtttggtc tgttaaaggc cgattacaac actaagagac tatactggag accctcagca	1380
ctagtatata gggaaatcgc cacaatggc gcaataactg atgaaataga gcacttaaat	1440
agcgtacctc cagtaaagcc attaaggcac	1470

<210> 44

<211> 490

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Beta-galactosidasa mutante de Sulfolobus solfataricus que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (62)..(64)

<223>

<400> 44

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

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

Leu Tyr Asp Val Leu Thr Lys Tyr Trp Asn Arg Tyr His Leu Tyr Met
370 375 380

Tyr Val Thr Glu Asn Gly Ile Ala Asp Asp Ala Asp Tyr Gln Arg Pro
385 390 395 400

Tyr Tyr Leu Val Ser His Val Tyr Gln Val His Arg Ala Ile Asn Ser
405 410 415

Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Ala Asp Asn Tyr
420 425 430

Glu Trp Ala Ser Gly Phe Ser Met Arg Phe Gly Leu Leu Lys Val Asp
435 440 445

Tyr Asn Thr Lys Arg Leu Tyr Trp Arg Pro Ser Ala Leu Val Tyr Arg
450 455 460

Glu Ile Ala Thr Asn Gly Ala Ile Thr Asp Glu Ile Glu His Leu Asn
465 470 475 480

Ser Val Pro Pro Val Lys Pro Leu Arg His
485 490

<210> 45

<211> 1488

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-galactosidasa mutante de *Picrophilus torridus* que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 45

atggggtttac ccaagaactt tttacttggc ttttctcttg ctggctttca gtctgaaatg	60
ggcatatcag atcctgatag caattcagat tgggtggttat ggggtacatga cccgggtgaat	120
ataaggactg gacttgtatc tgggtgactta cctgaaaatg gaataggata ctggaaccgc	180
actaaaaaat ataatggtct ggctgttcaa acaggaatga atgctgcaag gcttggagtt	240
gaatggagca ggatatttcc aaaaagtact gaagaagtaa aggtgatgga agattacaaa	300
gatgatgatt taatttccgt ggatgttaat gaggggaagtc ttgaaaaact tgacagactg	360
gcaaatcaaa aggcaattaa tagatatatg gaaatcttca ataatatcaa ggaaaataat	420
atgacgctaa tagtgaatgt ttaccattgg ccaataccaa tatatcttca cgatccaata	480
gaagctagga atagtggact ttcaaataaa agaaatggct ggcttaatca taaaaccgtt	540
gtggaatttg taaaatatgc aaaatatctg gcatggaaat ttagcgatgt ggcagatatg	600
ttttctataa tgaatgagcc aaacgttgta tttggtaatg gatattttta tgttaaataca	660
gggttccac cagcatttcc aagtgtgcat ggcggtttgc ttgcaaaaaa acatgaaatt	720
gaggctatag caagatcata cgacgccatg aaggagatta caaaaaaacc agttggtcta	780
attatggcaa attcagatgt acaaccacta acagatgagg ataaagaagc agcagaaatg	840
gctacttaca atgatcgcta ttcatccta gatccgctaa gagttggtga gatgaaatgg	900
gctgatgagg ttactgcagg taatccaatt ggtgaaaaga gcaacatcga tagatctgat	960
ctaaaaaata agctagactg gataggtgtt aactattata caagggccgt tgtaaaaaaa	1020
tctggaaacg gatatacaac attaaaagga tatggacact ctgcaaccgc tggcatgcc	1080
agtagggccg gaagggatgt aagtgacttt ggctgggaat tttatccaga aggtcttgta	1140
aacgtcttat catcactctg gaaaagatat cacattccaa tgattgtgac tgaaaatggt	1200
gttgtgact ctattgatag acttagacca aggtaccttg tgtcacatat aaagtctgtt	1260
gaaaaggctt tatctatggg tatggatatt aggggatatc ttcactggtc tctgattgat	1320
aactatgaat gggcatcagg tttttcaatg aaatttgggc tttatggtat tgatttgaac	1380
aataaaaaga ttcaacacag accaagtgc ctggtattta aagaaattgc aaatgccaac	1440
ggagtcccgg aggaatttga atggatggca gaccagcatc agaactca	1488

<210> 46

<211> 496

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Beta-galactosidasa mutante de *Picrophilus torridus* que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (59)..(61)

<223>

<400> 46

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

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

340	345	350
His Ser Ala Thr Ala Gly Met Pro Ser Arg Ala Gly Arg Asp Val Ser		
355	360	365
Asp Phe Gly Trp Glu Phe Tyr Pro Glu Gly Leu Val Asn Val Leu Ser		
370	375	380
Ser Tyr Trp Lys Arg Tyr His Ile Pro Met Ile Val Thr Glu Asn Gly		
385	390	395
Val Ala Asp Ser Ile Asp Arg Leu Arg Pro Arg Tyr Leu Val Ser His		
405	410	415
Ile Lys Ser Val Glu Lys Ala Leu Ser Met Gly Met Asp Ile Arg Gly		
420	425	430
Tyr Leu His Trp Ser Leu Ile Asp Asn Tyr Glu Trp Ala Ser Gly Phe		
435	440	445
Ser Met Lys Phe Gly Leu Tyr Gly Ile Asp Leu Asn Asn Lys Lys Ile		
450	455	460
Gln His Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe Lys Glu Ile Ala Asn Ala Asn		
465	470	475
Gly Val Pro Glu Glu Phe Glu Trp Met Ala Asp Gln His Gln Asn Ser		
485	490	495

<210> 47

<211> 1443

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-galactosidasa mutante de Thermosphaera volcanium que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 47

atggttagaaa acaattttcc agaggatttc aaatttggtt ggtcacagtc aggttttcaa	60
tccgagatgg gctatgataa cgcaatggac gataaaagtg actggtatgt ctgggttcac	120
gataaagaaa acatccaatc agggcttgta agcggagaca tgcccgaataa tgggtccgggt	180
tactggaacc gcactaaatc attccatgaa gctgcacaga atatgggatt aaaaatggca	240
agaatcggag ttgaatggtc aagattattc ccggaacctt tcccggaaaa aataatggca	300
gatgcaaaaa ataattcctt agaaataaac aataacattc ttccagaact tgataaatat	360
gtcaataaag atgcactcaa ccattacatt gagatattta atgatatcaa aaatagaaat	420
atagatttaa taattaatat gtaccactgg ccacttcctg tatggctaag cgatcctgta	480
tctgttagaa aaggaataaa aacagaaaga tcaggctggc tgaatgacag gatagttcaa	540
ttgtttgctt tattctcttc gtatatagta tataaaatgg aagatctggc agttgcattt	600
tcaaccatga atgaacctaa tgttggttat ggaaatgggt ttataaatat caaatcaggt	660
tttccgcctt cctatctcag ttcagaattt gcatctaaag ttaagaacaa tatattaaaa	720
gcacattctc ttgcatacga ttctatgaaa aaaattacgg ataaacctgt gggaataatt	780
tatgcaaaca catattttac gcctttggac ccggaaaaag ataatgatgc tattgctaaa	840
gcagacagtg atgcgaaatg gtcatttttt gatccattaa taaaaggaga taaatcactt	900
ggaattaatg gcaataaact agattggatc ggaattaatt attatacaag gacaatgtta	960
aggaaagacg gagatggcta tatttcatta aaaggctatg gtcattcagg ttctccta	1020
actgtaacaa acgataaaag accaacaagt gatataggat gggaatttta tccggaggga	1080
ttggaatatg taattatgaa ttactggaac aggtataaat tgccatgta cgtaacagaa	1140
aatggcatag ccgataatgg ggattatcag aggccttatt atttagtttc acacattgca	1200
agtgtactga gggcaataaa taaaggagcc aatgtaaagg gttatttgca ctggtcctta	1260
gttgataatt atgaatgggc attgggattt agcccgaaat ttggttta	1320
gaaaataaaa aactatactg gaggccaaat gctcttgttt ataaggaaat agcaacaaaa	1380
aattgcatat cccagaatt aaagcacctc gattcaatac cgcctataaa tggtttaaga	1440
aaa	1443

<210> 48

<211> 481

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Beta-galactosidasa mutante de Thermosphaera volcanium que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (63)..(65)

<223>

<400> 48

Met Val Glu Asn Asn Phe Pro Glu Asp Phe Lys Phe Gly Trp Ser Gln
1 5 10 15

Ser Gly Phe Gln Ser Glu Met Gly Tyr Asp Asn Ala Met Asp Asp Lys
20 25 30

Ser Asp Trp Tyr Val Trp Val His Asp Lys Glu Asn Ile Gln Ser Gly
35 40 45

Leu Val Ser Gly Asp Met Pro Glu Asn Gly Pro Gly Tyr Trp Asn Arg
50 55 60

Thr Lys Ser Phe His Glu Ala Ala Gln Asn Met Gly Leu Lys Met Ala
 65 70 75 80

Arg Ile Gly Val Glu Trp Ser Arg Leu Phe Pro Glu Pro Phe Pro Glu
 85 90 95

Lys Ile Met Ala Asp Ala Lys Asn Asn Ser Leu Glu Ile Asn Asn Asn
 100 105 110

Ile Leu Ser Glu Leu Asp Lys Tyr Val Asn Lys Asp Ala Leu Asn His
 115 120 125

Tyr Ile Glu Ile Phe Asn Asp Ile Lys Asn Arg Asn Ile Asp Leu Ile
 130 135 140

Ile Asn Met Tyr His Trp Pro Leu Pro Val Trp Leu Ser Asp Pro Val
 145 150 155 160

Ser Val Arg Lys Gly Ile Lys Thr Glu Arg Ser Gly Trp Leu Asn Asp
 165 170 175

Arg Ile Val Gln Leu Phe Ala Leu Phe Ser Ser Tyr Ile Val Tyr Lys
 180 185 190

Met Glu Asp Leu Ala Val Ala Phe Ser Thr Met Asn Glu Pro Asn Val
 195 200 205

Val Tyr Gly Asn Gly Phe Ile Asn Ile Lys Ser Gly Phe Pro Pro Ser
 210 215 220

Tyr Leu Ser Ser Glu Phe Ala Ser Lys Val Lys Asn Asn Ile Leu Lys
 225 230 235 240

Ala His Ser Leu Ala Tyr Asp Ser Met Lys Lys Ile Thr Asp Lys Pro
 245 250 255

Val Gly Ile Ile Tyr Ala Asn Thr Tyr Phe Thr Pro Leu Asp Pro Glu
 260 265 270

Lys Asp Asn Asp Ala Ile Ala Lys Ala Asp Ser Asp Ala Lys Trp Ser
 275 280 285

Phe Phe Asp Pro Leu Ile Lys Gly Asp Lys Ser Leu Gly Ile Asn Gly
 290 295 300

Asn Lys Leu Asp Trp Ile Gly Ile Asn Tyr Tyr Thr Arg Thr Met Leu
 305 310 315 320

Arg Lys Asp Gly Asp Gly Tyr Ile Ser Leu Lys Gly Tyr Gly His Ser
325 330 335

Gly Ser Pro Asn Thr Val Thr Asn Asp Lys Arg Pro Thr Ser Asp Ile
340 345 350

Gly Trp Glu Phe Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Tyr Val Ile Met Asn Tyr
355 360 365

Trp Asn Arg Tyr Lys Leu Pro Met Tyr Val Thr Glu Asn Gly Ile Ala
370 375 380

Asp Asn Gly Asp Tyr Gln Arg Pro Tyr Tyr Leu Val Ser His Ile Ala
385 390 395 400

Ser Val Leu Arg Ala Ile Asn Lys Gly Ala Asn Val Lys Gly Tyr Leu
405 410 415

His Trp Ser Leu Val Asp Asn Tyr Glu Trp Ala Leu Gly Phe Ser Pro
420 425 430

Lys Phe Gly Leu Ile Gly Tyr Asp Glu Asn Lys Lys Leu Tyr Trp Arg
435 440 445

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

Pro Glu Leu Lys His Leu Asp Ser Ile Pro Pro Ile Asn Gly Leu Arg
465 470 475 480

Lys

<210> 49

<211> 1404

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN que codifica la familia de proteínas glucósido hidrolasa mutante de Fervidobacterium nodosum que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 49

```

atgggtatgt ttccgaaaga ttttttattt ggtgtttcga tgtctgggtt tcagtttgag      60
atgggaaatc ctcaagatgc agaagagggt gatctaaata cagattggta tgtatgggtt      120
agggatattg gaaatattgt aaatggagtc gtaagtgggg acttgccctga aaatggttca      180
tggtactgga accgcactgg caaagtccac caattagctg ccgattttgg gatggatgta      240
atacgaattg gaaccgaatg gtctaggatt ttcccagtta gtacgcaaag tgttgagtac      300

ggctcaccgg atatgctcga aaaattggat aaattagcaa accaaaaagc ggtaagtcac      360
tacaggaaaa taatggagga tataaaagca aaggggttaa aattgttcgt taacctttac      420
cactttactt tacctatttg gttgcacgac cctatagctg ttcacaaagg tgagaagaca      480
gataaaattg gttggatttc tgatgctaca cctattgagt ttgcgaagta tgcagagtac      540
atggcgtgga aatttgccga tatagttgat atgtgggctt ctatgaacga accacacggt      600
gtaagtcagc ttggatattt tgcaataaat gcgggatttc caccaagtta ttttaaccc      660
tcatggtata tcaaaagttt agaaaacgaa gcgaaagcac ataacttatc ttatgatgct      720
ataaaaaagt atacaaataa tcctgttgga gttatatact cttttacatg gtacgatact      780
gttaataaaag atgacaagga atcttttgaa aatgctatgg atctcacaaa ttggcgattt      840
atagatatgg taaaagataa aactgattac ataggtgtaa attattacac aagagcgggt      900
atcgatagac ttcccaccac tattgacttt ggcgaaattta aaatgaattg gtatactttg      960
agaggttacg gttattcttg cgaagaagga ggattctcac tctccggaag gccggcaagc     1020
gaatttggat gggaaatata ccctgaaggg ctgtacaata ttttgataca tgtttataat     1080
agatacaaaa aagatattta tgttacggag aacggtatag ctgattcgaa ggataaatac     1140
agaagtcttt ttatcatatc gcatctttat gctatagaaa aagcattaaa cgaaggaata     1200
ccaataaaaag gttatttgca ctggtcgatt atagacaatt tcgaatgggc gaagggctac     1260
agtaaaagat ttggacttgc ttacacagat ttgtcaacca aaaaatatat acctagacct     1320
tctatgtaca tttttagaga gataataaag gataaatcaa tcgacaaatt caaagggttac     1380
gatccatata acttgatgaa attc                                             1404

```

<210> 50

<211> 468

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Familia de proteínas glucósido hidrolasa mutante de Fervidobacterium nodosum que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (64) .. (66)

<223>

<400> 50

Met Gly Met Phe Pro Lys Asp Phe Leu Phe Gly Val Ser Met Ser Gly
1 5 10 15

Phe Gln Phe Glu Met Gly Asn Pro Gln Asp Ala Glu Glu Val Asp Leu
20 25 30

Asn Thr Asp Trp Tyr Val Trp Val Arg Asp Ile Gly Asn Ile Val Asn
35 40 45

Gly Val Val Ser Gly Asp Leu Pro Glu Asn Gly Ser Trp Tyr Trp Asn
 50 55 60

Arg Thr Gly Lys Val His Gln Leu Ala Ala Asp Phe Gly Met Asp Val
 65 70 75 80

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

Ser Val Glu Tyr Gly Ser Pro Asp Met Leu Glu Lys Leu Asp Lys Leu
 100 105 110

Ala Asn Gln Lys Ala Val Ser His Tyr Arg Lys Ile Met Glu Asp Ile
 115 120 125

Lys Ala Lys Gly Leu Lys Leu Phe Val Asn Leu Tyr His Phe Thr Leu
 130 135 140

Pro Ile Trp Leu His Asp Pro Ile Ala Val His Lys Gly Glu Lys Thr
 145 150 155 160

Asp Lys Ile Gly Trp Ile Ser Asp Ala Thr Pro Ile Glu Phe Ala Lys
 165 170 175

Tyr Ala Glu Tyr Met Ala Trp Lys Phe Ala Asp Ile Val Asp Met Trp
 180 185 190

Ala Ser Met Asn Glu Pro His Val Val Ser Gln Leu Gly Tyr Phe Ala
 195 200 205

Ile Asn Ala Gly Phe Pro Pro Ser Tyr Phe Asn Pro Ser Trp Tyr Ile
 210 215 220

Lys Ser Leu Glu Asn Glu Ala Lys Ala His Asn Leu Ser Tyr Asp Ala
 225 230 235 240

Ile Lys Lys Tyr Thr Asn Asn Pro Val Gly Val Ile Tyr Ser Phe Thr
 245 250 255

Trp Tyr Asp Thr Val Asn Lys Asp Asp Lys Glu Ser Phe Glu Asn Ala
 260 265 270

Met Asp Leu Thr Asn Trp Arg Phe Ile Asp Met Val Lys Asp Lys Thr
 275 280 285

Asp Tyr Ile Gly Val Asn Tyr Tyr Thr Arg Ala Val Ile Asp Arg Leu
 290 295 300

Pro Thr Thr Ile Asp Phe Gly Glu Phe Lys Met Asn Trp Tyr Thr Leu
305 310 315 320

Arg Gly Tyr Gly Tyr Ser Cys Glu Glu Gly Gly Phe Ser Leu Ser Gly
325 330 335

Arg Pro Ala Ser Glu Phe Gly Trp Glu Ile Tyr Pro Glu Gly Leu Tyr
340 345 350

Asn Ile Leu Ile His Val Tyr Asn Arg Tyr Lys Lys Asp Ile Tyr Val
355 360 365

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

Ile Ile Ser His Leu Tyr Ala Ile Glu Lys Ala Leu Asn Glu Gly Ile
385 390 395 400

Pro Ile Lys Gly Tyr Leu His Trp Ser Ile Ile Asp Asn Phe Glu Trp
405 410 415

Ala Lys Gly Tyr Ser Lys Arg Phe Gly Leu Ala Tyr Thr Asp Leu Ser
420 425 430

Thr Lys Lys Tyr Ile Pro Arg Pro Ser Met Tyr Ile Phe Arg Glu Ile
435 440 445

Ile Lys Asp Lys Ser Ile Asp Lys Phe Lys Gly Tyr Asp Pro Tyr Asn
450 455 460

Leu Met Lys Phe
465

<210> 51

<211> 1419

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 51

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (60)..(62)

<223>

<400> 52

Met	Ala	Lys	Phe	Pro	Lys	Asn	Phe	Met	Phe	Gly	Tyr	Ser	Trp	Ser	Gly
1				5					10					15	

Phe	Gln	Phe	Glu	Met	Gly	Leu	Pro	Gly	Ser	Glu	Val	Glu	Ser	Asp	Trp
			20					25					30		

atggcaaaagt tcccaaaaaa cttcatgttt ggatattctt ggtctgggtt ccagtttgag	60
atgggactgc caggaagtga agtggaaagc gactggtggg tgtgggttaa cgacacggag	120
aacatagcat caggtctagt aagtggagat ctaccagaga acggcccagc atattggaac	180
cgcactaagc aagatcatga cattgcagaa aagctaggaa tggattgtat tagagggtggc	240
attgagtggg caagaatttt tccaaagcca acatttgacg ttaaagttga tgtggaaaag	300
gatgaagaag gcaacataat ttccgtagac gttccagaga gtacaataaa agagctagag	360
aaaattgcca acatggaggc ccttgaacat tatcgcaaga tttactcaga ctggaaggag	420
aggggcaaaa ccttcatatt aaacctctac cactggcctc ttccattatg gattcatgac	480
ccaattgcag taaggaaaact tggcccggat agggctcctg caggatggtt agatgagaag	540
acagtggtag agtttgtgaa gtttgccgcc ttcgttgctt atcaccttga tgacctcgtt	600
gacatgtgga gcacaatgaa cgaaccaaac gtagtctaca atcaaggtta cattaatcta	660
cgttcaggat ttccaccagg atatctaagc tttgaagcag cagaaaaggc aaaattcaac	720
ttaattcagg ctccacatcg agcatatgat gccataaaag agtattcaga aaaatccgtg	780
ggagtgatat acgcctttgc ttggcacgat cctctagcgg aggagtataa ggatgaagta	840
gaggaaatca gaaagaaaga ctatgagttt gtaacaattc tacactcaaa aggaaagcta	900
gactggatcg gcgtaaacta ctactccagg ctggtatatg gagccaaaga tggacaccta	960
gttcctttac ctggatatgg atttatgagt gagagaggag gatttgcaaa gtcaggaaga	1020
cctgctagtg actttggatg ggaaatgtac ccagagggcc ttgagaacct tcttaagtat	1080
ttaaacaatg cctacgagct accaatgata attacagaga acggtatggc cgatgcagca	1140
gatagataca ggccacacta tctcgtaagc catctaaagg cagtttacia tgctatgaaa	1200
gaagggtgctg atgttagagg gtatctccac tgggtctctaa cagacaacta cgaatgggcc	1260
caagggttca ggatgagatt tggattggtt tacgtggatt tcgagacaaa gaagagatat	1320
ttaaggccaa gcgccttggc attcagagaa atagccactc aaaaagaaat tccagaagaa	1380
ttagctcacc tcgcagacct caaatttggtt acaagaaag	1419

<210> 52

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (37)..(39)

<223>

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

Glu Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly
290 295 300

Val Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu
305 310 315 320

Val Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala
325 330 335

Lys Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu
340 345 350

Gly Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Ala Tyr Glu Leu Pro
355 360 365

Met Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg
370 375 380

Pro His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys
385 390 395 400

Glu Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn
405 410 415

Tyr Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val
420 425 430

Asp Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe
435 440 445

Arg Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu
450 455 460

Ala Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys
465 470

<210> 53

<211> 1419

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 53

```

atggcaaaagt tcccaaaaaa cttcatgttt ggatattctt ggtctggttt ccagtttgag      60
atgggactgc caggaagtga agtggaaagc gactggtggg tgtgggttca cgacaaggag      120
aacatagcat caggtctagt aagtggagat ctaccagaga acggcccagc atattggaac      180
cgcactaagc aagatcatga cattgcagaa aagctaggaa tggattgtat tagaggtggc      240

attgagtggg caagaatttt tccaaagcca acatttgacg ttaaagttga tgtggaaaag      300
gatgaagaag gcaacataat ttccgtagac gttccagaga gtacaataaa agagctagag      360
aaaattgcc aacatggagc ccttgaacat tatcgcaaga tttactcaga ctggaaggag      420
aggggcaaaa ccttcatatt aaacctctac cactggcctc ttccattatg gattcatgac      480
ccaattgcag taaggaaact tggcccgat agggctcctg caggatggtt agatgagaag      540
acagtggtag agtttgtgaa gtttgccgcc ttcgttgctt atcaccttga tgacctcgtt      600
gacatgtgga gcacaatgaa cgaaccaaac gtagtctaca atcaaggtta cattaatcta      660
cgttcaggat ttccaccagg atatctaaac tttacagcag cagaaaaggc aaaattcaac      720
ttaattcagg ctcacatcgg agcatatgat gccataaaag agtattcaga aaaatccgtg      780
ggagtgatat acgcctttgc ttggcacgat cctctagcgg aggagtataa ggatgaagta      840
gaggaaatca gaaagaaaga ctatgagttt gtaacaattc tacactcaa aggaaagcta      900
gactggatcg gcgtaaacta ctactccagg ctggtatatg gagcaaaga tggacaccta      960
gttcctttac ctggatatgg atttatgagt gagagaggag gatttgcaa gtcaggaaga     1020
cctgctagtg actttggatg ggaaatgtac ccagagggcc ttgagaacct tcttaagtat     1080
ttaaacaatg cctacgagct accaatgata attacagaga acggtatggc cgatgcagca     1140
gatagataca ggccacacta tctcgtaagc catctaaagg cagtttacia tgctatgaaa     1200
gaagggtgctg atgttagagg gtatctccac tgggtctctaa cagacaacta cgaatgggcc     1260
caagggttca ggatgagatt tggattggtt tacgtggatt tcgagacaaa gaagagatat     1320
ttaaggccaa gcgccctggt attcagagaa atagccactc aaaaagaaat tccagaagaa     1380
ttagctcacc tcgcagacct caaatttggtt acaagaaag                                     1419

```

<210> 54

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (60)..(62)

<223>

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (230)..(232)

<223>

<400> 54

Met	Ala	Lys	Phe	Pro	Lys	Asn	Phe	Met	Phe	Gly	Tyr	Ser	Trp	Ser	Gly
1				5					10					15	

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

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

<210> 55

<211> 1419

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> ADN que codifica beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación.

<400> 55

atggcaaagt tcccaaaaaa cttcatgttt ggatattctt ggtctggttt ccagtttgag	60
atgggactgc caggaagtga agtggaaagc gactgggtggg tgtgggttca cgacaaggag	120
aacatagcat caggtctagt aagtggagat ctaccagaga acggcccagc atattggaac	180
cgactaagc aagatcatga cattgcagaa aagctaggaa tggattgtat tagaggtggc	240
attgagtggg caagaatttt tccaaagcca acatttgacg ttaaagttga tgtggaaaag	300
gatgaagaag gcaacataat ttccgtagac gttccagaga gtacaataaa agagctagag	360
aaaattgcc aatggaggc ccttgaacat tatcgcaaga tttactcaga ctggaaggag	420
aggggcaaaa cttcatatt aaacctctac cactggcctc ttccattatg gattcatgac	480
ccaattgcag taaggaaact tggcccggat agggctcctg caggatgggt agatgagaag	540
acagtggtag agtttgtgaa gtttgccgcc ttcgttgctt atcaccttga tgacctcgtt	600
gacatgtgga gcacaatgaa cgaaccaaac gtagtctaca atcaaggtta cattaatcta	660
cgttcaggat ttccaccagg atatctaagc tttgaagcag cagaaaaggc aaaattcaac	720
ttaattcagg ctcacatcgg agcatatgat gccataaaag agtattcaga aaaatccgtg	780
ggagtgatat acgcctttgc ttggcacgat cctctagcgg aggagtataa ggatgaagta	840
gaggaaatca gaaagaaaga ctatgagttt gtaacaattc tacactcaaa aggaaagcta	900
gactggatcg gcgtaacta ctactccagg ctggtatatg gagccaaaga tggacaccta	960
gttcctttac ctggatatgg atttatgagt gagagaggag gatttgcaaa gtcaggaaga	1020
cctgctagtg actttggatg ggaaatgtac ccagagggcc ttgagaacct tcttaagtat	1080
ttaaacaata actacacgct accaatgata attacagaga acggtatggc cgatgcagca	1140
gatagataca ggccacacta tctcgtaagc catctaaagg cagtttacia tgctatgaaa	1200
gaagggtgctg atgttagagg gtatctccac tggctctctaa cagacaacta cgaatgggcc	1260
caagggttca ggatgagatt tggattgggt tacgtggatt tcgagacaaa gaagagatat	1320
ttaaggccaa gcgccctggt attcagagaa atagccactc aaaaagaaat tccagaagaa	1380
ttagctcacc tcgcagacct caaatttggt acaagaaag	1419

<210> 56

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Beta-glucosidasa mutante que tiene un sitio de glucosilación.

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (60)..(62)

<223>

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (364)..(366)

<223>

<400> 56

Met Ala Lys Phe Pro Lys Asn Phe Met Phe Gly Tyr Ser Trp Ser Gly

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

Ala Glu Glu Tyr Lys Asp Glu Val Glu Glu Ile Arg Lys Lys Asp Tyr
275 280 285

Glu Phe Val Thr Ile Leu His Ser Lys Gly Lys Leu Asp Trp Ile Gly
290 295 300

Val Asn Tyr Tyr Ser Arg Leu Val Tyr Gly Ala Lys Asp Gly His Leu
305 310 315 320

Val Pro Leu Pro Gly Tyr Gly Phe Met Ser Glu Arg Gly Gly Phe Ala
325 330 335

Lys Ser Gly Arg Pro Ala Ser Asp Phe Gly Trp Glu Met Tyr Pro Glu
340 345 350

Gly Leu Glu Asn Leu Leu Lys Tyr Leu Asn Asn Asn Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Met Ile Ile Thr Glu Asn Gly Met Ala Asp Ala Ala Asp Arg Tyr Arg
370 375 380

Pro His Tyr Leu Val Ser His Leu Lys Ala Val Tyr Asn Ala Met Lys
385 390 395 400

Glu Gly Ala Asp Val Arg Gly Tyr Leu His Trp Ser Leu Thr Asp Asn
405 410 415

Tyr Glu Trp Ala Gln Gly Phe Arg Met Arg Phe Gly Leu Val Tyr Val
420 425 430

Asp Phe Glu Thr Lys Lys Arg Tyr Leu Arg Pro Ser Ala Leu Val Phe
435 440 445

Arg Glu Ile Ala Thr Gln Lys Glu Ile Pro Glu Glu Leu Ala His Leu
450 455 460

Ala Asp Leu Lys Phe Val Thr Arg Lys
465 470

<210> 57
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 57
gtgggtgtgg gttaacgaca cggagaacat agcatc 36

<210> 58
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 58
 caccacacacc caattgctgt gcctcttcta tcgtag 36

<210> 59
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 59
 ccaggatatc taaactttac agcagcagaa aaggca 36

<210> 60
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 60
 ggtctatatg atttgaaatg tcgtcgtctt ttccgt 36

<210> 61
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 61
 agtatttaaa caataactac acgctaccaa tgata 35

<210> 62
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 62
 tcataaattt gttattgatg tgcgatgggt actat 35

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una β -glucosidasa mutante derivada de un termófilo que tiene fijada selectivamente a ella una cadena de azúcares y también tiene una actividad glucosidasa, que comprende:

(i) preparar ADN que codifica una β -glucosidasa mutante derivada de un termófilo introduciendo una secuencia de ADN que codifica Asn-X-Ser o Asn-X-Thr (en las que, X es cualquier aminoácido excepto prolina) en ADN que codifica una β -glucosidasa derivada de un termófilo que está originalmente desprovista de una secuencia de glucosilación y, además, añadiendo una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal de secreción al ADN que codifica una β -glucosidasa mutante,

(ii) introducir el ADN que codifica una β -glucosidasa mutante al que se le ha añadido la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de secreción en un microorganismo eucariota, de modo que una β -glucosidasa mutante codificada por el ADN de la β -glucosidasa mutante se exprese como una proteína secretora, y

(iii) aislar y purificar la β -glucosidasa mutante expresada de este modo como una proteína secretora.

2. Procedimiento para producir una β -glucosidasa mutante, según la reivindicación 1, en el que la cadena de azúcares es una cadena de azúcares de tipo rica en manosa.

3. Procedimiento para producir una β -glucosidasa mutante, según la reivindicación 1 ó 2, en el que la β -glucosidasa derivada de un termófilo es una β -glucosidasa derivada de un termófilo seleccionado entre el grupo que comprende el género *Sulfolobus*, el género *Thermoplasma*, el género *Caldivirga*, el género *Thermosphaera*, el género *Pyrococcus*, el género *Picrophilus*, el género *Caldivirga* y el género *Fervidobacterium*.

4. Procedimiento para producir una β -glucosidasa mutante, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la β -glucosidasa derivada de un termófilo es una proteína que comprende:

(i) una secuencia de aminoácidos igual que cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, o

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene el 85% o más de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 20, y también una actividad β -glucosidasa.

5. Procedimiento para producir una β -glucosidasa mutante, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el microorganismo eucariota es *Pichia pastoris*.

6. Procedimiento para producir una β -glucosidasa mutante, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la secuencia señal de secreción es una secuencia señal de secreción de factor α .

7. Procedimiento para producir una β -glucosidasa mutante, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la β -glucosidasa mutante derivada de un termófilo comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54 y SEQ ID NO: 56.

8. Composición enzimática para sacarificación de biomasa que comprende celulasa y la β -glucosidasa mutante derivada de un termófilo obtenida mediante el procedimiento de producción, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Composición enzimática para sacarificación de biomasa, según la reivindicación 8, en la que la celulasa es una mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos.

10. Composición enzimática para sacarificación de biomasa, según la reivindicación 8 ó 9, en la que la mezcla de celulasas derivadas de hongos filamentosos es una mezcla de celulasas derivadas del género *Trichoderma*.

11. Procedimiento para hidrolizar biomasa, que comprende utilizar la composición enzimática, según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10.

12. Procedimiento para hidrolizar biomasa, según la reivindicación 11, que comprende filtrar un hidrolizado obtenido por la composición enzimática a través de una membrana de ultrafiltración, y separar y recuperar la composición enzimática utilizada.

Fig. 1

TriReBGL 1 —MLPKDFQWGFATAAYQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQPGKIADGSSSGVTACDS—YN
 AspNiBGL 1 —MLPKDLQWGFKAAYQIEGAVDQDGRGPSIWDTFCAQPGKIADGSSSGVTACDS—YN
 PfuBGL 1 MAKFPKNFMFGYSWSGFQFEMGLPGSEVESDWWVWVHDKENIASGLVSGDLPENGPAYWH

TriReBGL 56 RTAEDIALLKSLGAKSYRFSISWSRIIEGGRGDAVNQAG————IDHYVKFVDDLL
 AspNiBGL 56 RTAEDIALLKSLGAKSYRFSISSR—IEGGRGDAVNQAG————IDHYVKFVDDLL
 PfuBGL 61 LYKQDHDIAEKLGMDCIRGGIEWARIFPKPTFDVKVDVEKDEEGNIISVDVPESTIKELE

TriReBGL 108 DAGITPFI TLFWDLPEGLHQRYGGLNRTEFPLDFENYARVMFRALPKVRNWITFNEPL
 AspNiBGL 106 DAGITPFI TLFWDL—LHQRYGGLNRTEFPLDFENYARVMFRALPKVR—NWNNEPL
 PfuBGL 121 KIANMEALEHYRKIYSDWKERKGTFLNLVHWPLPLWIHDP IAVRKLGPDRAPAGWLDEK

TriReBGL 168 CSAIPGYGSGTFAPGRQSTSEPTVGHNILVAHGRAVKAYRDDFKPASGDGQIGIVLNGD
 AspNiBGL 160 CSAIPGYGSGSFAPGRQSTSEPTVGHNILVAHGRAVKAYRDDFKPASGDGQIGIVLNGD
 PfuBGL 181 TVVEFVKFAAFVAYHDDLVDWMSTMNEPNVVYNQGYINLRSGFPPGYLSFEAAEKAKFN

TriReBGL 228 FTYPWDAADPADKEAAERRLEFFTAWFADPIYLGDPASMRKQLGDRLPTFTPEERALVH
 AspNiBGL 220 FTYPWDAADPADKE—RLEFFTAWFADPIYLGDPASMRKQLGDRLPTFTPEERALVH
 PfuBGL 241 LIQAHIGAYDAIKE—YSEKSGVIYAFAWHDPLAEYKDEVEEIRKKDYEFVT

TriReBGL 288 GSNDFYGMNHYTSNYIRhrSSPASADDTVGNDVLFNTKQNCIG—PETQSPWLRPCA
 AspNiBGL 276 GSNDFYGMNHYTSNYIRhrSSPASADDTVGNDVLFNTKQNCIG—PETQSPWLRPCA
 PfuBGL 293 ILHSGKLDWIGVNYYSRLVYGAKDGLVPLPGYGFMSERGGFAKSGRPASDFGWEMYPE

TriReBGL 345 AGFRDFLVWISKRYGYPIYVTENGTSIKGESDLPKEKILEDDFRVKYNEYIRAMVTAV
 AspNiBGL 333 AGFRDFLVWTSKRYGSPPIYVTENGTSIKGESDLPNEKILEDDFRVKYNEYIRAMVTAV
 PfuBGL 353 G-LENLLKYLNNAYELP-MIITENG—MADAADRYRPHYLVSHLKAVYNA

TriReBGL 405 ELDGVNVKGYFAWSLMDNFEWADGYVTRFGVTYVDYENGQKRFP—KKSA
 AspNiBGL 393 ELDGVNVR—FGVTYVDYENGQKRFP—KKSA
 PfuBGL 399 MKEGADVREGYLHWSLTDNYEWAQGFMRFGLVYVDFETKKRYLRPSALVFREIATQKEIP

TriReBGL 453 KSLKPLFDELI AAA—
 AspNiBGL 421 KSLKPLFDELI AAA—
 PfuBGL 459 EELAH LADLK FVTRK

Fig. 2-1

gPfuBGL	1	—MAKFPKNFMFGYSWSGFQFEMG—LPGSE—VESDWWVWVHDKENIASGLVSGDLPEN
ThAggBGY	1	—MKFPKDFMIGYSSSPFQFEAG—IPGSEDPNSDWWVWVHDPENTAAGLVSGDFPEN
CmGHFP	1	—MIKFPSDFRFGFSTVGTQHEMG—TPGSE—FVSDWYVWLHDPENIASGLVSGDLPEN
SaBGAL	1	—MLSFPKGFKGWSQSGFQSEMG—TPGSEDPNSDWHVWVHDRENIVSQVVSGLDPEN
SsoBGAL	1	—MYSFPNSFRFGWSQAGFQSEMG—TPGSEDPNTDWYKVVHDPENMAAGLVSGDLPEN
TvBGAL	1	MVENNFPEDFKFGWSQSGFQSEMG—YDNAMDDKSDWYVWVHDKENIQSGLVSGDMPEN
PtBGAL	1	—MLPKNFLLGFSLAGFQSEMG—ISD—PDSNSDWWVWVHDPVNI RTGLVSGDLPEN
FnGHFP	1	—MMFPKDFLFGVSMGSGFQFEMGNPQDAEEVDLNTDWYVWVRDIGNIVNGVVSGLDPEN

gPfuBGL	55	GPAYWNRTKQDHDIAEKLGMDCIRGGIEWARIFPKPTFDVKVDVEKDEEG—NIISVDVPE
ThAggBGY	55	GPGYWNLNQNDHDLAEKLGVTIRVGVEWSRIFPKPTFNVKVPVERDENG—SIVHVDVDD
CmGHFP	55	GPGYWDLTKQDHSIARDLGLDAAWITIEWARVFPKPTFDVKVKVDEDDGG—NVVDVEVNE
SaBGAL	56	GPGYWGNKYKRFHDEAEKIGLNAVRINVEWSRIFPRPLPKPEMQTGTOKENSPVISVDLNE
SsoBGAL	56	GPGYWGNKYKTFHDNAQKMGKLIARLNVESRIFPNPLPRP—QNFDESKQDVTEVEINE
TvBGAL	58	GPGYWNNYKSFHEAAQNMGKLMARIGVEWSRLFPEPFPEKIMADAKNN—SLEINN
PtBGAL	53	GIGYWDLYKKYNGLAVQTGMNAARLGVEWSRIFPKSTEEVKVMEDYKDD—DLISVDVNE
FnGHFP	58	GSWYWKQYGVHQLAADFGMDVIRIGTEWSRIFPVSTQSVEY—GSP

gPfuBGL	114	STIKELEKIANMEALEHYRKIYSDWKERGKTFILNLYHWPLPLWIHDP AVRKLGPDRAP
ThAggBGY	114	KAVERLDELANKEAVNHYVEMYKDWVERGRKILNLYHWPLPLWLHNP MVRRMGPDRA
CmGHFP	114	SALEELRRLADLNAVNHRYGILSDWKERGGLLVINLYHWAMPTWLHDP AVRKNGPDRAP
SaBGAL	116	SKLREMDNYANHEALSHYRQILEDLNRNGFHVILNMYHWLPLWLHDP RVRR—GDFTGP
SsoBGAL	113	NELKRLDEYANKDALNHYREIFKDLKSRLGYFILNMYHWLPLWLHDP RVRR—GDFTGP
TvBGAL	112	NILSELDKYVNKDALNHYIEIFNDIKNRNIDLINMYHWLPLVWSDPVSVRK—GIKTER
PtBGAL	111	GSLEKLDRLANQKAINRYMEIFNNIKENMTLIVNVYHWP PIYLHDP EARNGLSNKR
FnGHFP	103	DMLEKLDKLANQKAVSHYRKIMEDIKAKGLKLFVNLYHFTLPIWLHDP AVHK—GEKTDK

gPfuBGL	174	AGWLDEKTVEFVKFAAFVAYHLDLVDWMSTMNEPNVVYNQGYINLRSGFPPGYLSFEA
ThAggBGY	174	SGWLNEESVVEFAKYAAYIAWKMGELPVMWSTMNEPNVVVEQGYMFVKGFPFGYLSLEA
CmGHFP	174	SGWLDKRSVIEFTKFAAFIAHELGDADMWYTMNEPGVVITEGYLVKSGFPFGYLDLNS
SaBGAL	175	TGWLNSRTVVEFARFSAYVAWKLDLASEYATMNEPNVWVGAGYAFPRAGFPFNYSFRL
SsoBGAL	172	SGWLSTRVVEFARFSAYIAWKFDLVDYESTMNEPNVVGGLGYGVKSGFPFGYLSFEL
TvBGAL	171	SGWLNDRIVQLFALFSSYIVYKMEDLAVAFSTMNEPNVVGNGFINIKSGFPFSSYLSSEF
PtBGAL	171	NGWLNHKTVEFVKYAKYLAWKFSVADMFSIMNEPNVVGNGYFNVKSGFPFAPFSPVHG
FnGHFP	162	IGWISDATPIEFAKYAEYMAWKFADIVDMWASMNEPHVVSQLGYFAINAGFPFSPFNPSW

gPfuBGL	234	AEKAKFNLIQAHIGAYDAIKEYSEKSVGIYAFAWHDPLAE—EYKDEVEEIRKKDYEFV
ThAggBGY	234	ADKARRNMIQAHARAYDNIKRFSKKPVGLIYAFQWFELLEG—PAEVFDKFKSSKLYYFT
CmGHFP	234	LATAGKHLIEAHARAYDAIKAYSRKPVLVSFADYQPLRQ—GDEEAVKEAKGLDYSFF
SaBGAL	235	SEIAKWNIIQAHARAYDAIKSVSKSVGIYANTSYPLRP—QDNEAVEIAERLNRWSFF
SsoBGAL	232	SRRAMYNIIQAHARAYDGIKSVSKPVGIYANSSFQPLTD—KDMEAVEAENDNRWWFF
TvBGAL	231	ASKVKNNILKAHSLAYDSMKKITDKPVGIIYANTYFTPLDPEKDNDIAKADSDAKWSFF
PtBGAL	231	GLLAKKHEIEAARSYDAMKEITKKPVGLIMANSOVQPLTD—EDKEAAEMATYNDRYSFI
FnGHFP	222	YIKSLENEAKAHNLSYDAIKKYTNPNVGVISFTWYDTVKN—DDKESFENAMDLTNWRFI

Fig. 2-2

gPfuBGL	292	TILHS-----KGKLDWIGVNYYSRLVYGAKDGH-----
ThAggBGY	292	DIVSKGSSIINVEY-----RRDLANRLDWLGVNYYSRVYKIVDDK-----
CmGHFP	292	DAPIKGELMG--VT-----RDDLKGRLDWIGVNYYTRAVLRRRQDAGRA-----
SaBGAL	294	DSIIKGEITSEGQ-----NVREDLRNRLDWIGVNYYTRTVVTKAESG-----
SsoBGAL	291	DAIIRGEITRGNEK-----IVRDDLKGRLDWIGVNYYTRTVVKRTEKG-----
TvBGAL	291	DPLIKGDKSLGIN-----GNKLDWIGINYYTRTMLRKDGDG-----
PtBGAL	290	DPLRVGEMKWADEVTAGNPIGEKSNI DRSDLKNKLDWIGVNYYTRAVVKKSGNG-----
FnGHFP	281	DMVKD-----KTDYIGVNYYTRAVIDRLPTTIDFGEF-----

gPfuBGL	320	---LVPLPGYGFMSERGGFAKSGRPASDFGWEMYPEGLENLLKYLNNAYELPMIITENGM
ThAggBGY	333	---PIILHGYGFLCTPGGISPAENPCSDFGWEVYPEGLYLLKELYNRYGVOLIVTENG
CmGHFP	334	---SVAVDGFGYSCEPGGVSNDRRPCSDFGWEIYPEGVYNVMDLWRRYRMPMIITENGI
SaBGAL	336	---YLTLPGYGDRCERNLSLANLPTSDFGWEFFPEGLYDVLKYWNRYGLPLYVMENGI
SsoBGAL	334	---YVSLGGYGHGCERNSVSLAGLPTSDFGWEFFPEGLYDVLTKYWNRYGLMYVTENGI
TvBGAL	327	---YISLKGYGHSASPNTVTNDKRPTSDIGWEFYPEGLEYYIMNYWNRYKLPYVTENGI
PtBGAL	344	---YTTLKGYGHSATAGMPSRAGRVDVSDFGWEFYPEGLVNVLSYWKRYHIPMIVTENG
FnGHFP	313	KMNWYTLRGYGSCEEGGFSLSGRPASEFGWEIYPEGLYNILIHVYNRYKKDIIYVTENGI

gPfuBGL	377	ADAADRYRPHYLVSHLKAVYNAMKEGADVRCYLHWSLTDNYEWAQGFMRFGLVYVDFET
ThAggBGY	390	SDSRDALRPAYLVSHVYSVWKAANEGIPVKGYLHWSLTDNYEWAQGFQRKFGLVMVDFKT
CmGHFP	392	ADEHDKWRSWFIVSHLYQIhrAMEEGVDVRCYFHWNLIDNLEWAAGYRMRFGLVYVDYAT
SaBGAL	393	ADDADYQRPYYLVSHIYQVhrALNEGVDVRCYLHWSLADNYEWSSGFSMRFGLLKVDYLT
SsoBGAL	391	ADDADYQRPYYLVSHVYQVhrAINSGADVRCYLHWSLADNYEWASGFSMRFGLLKVDYNT
TvBGAL	384	ADNGDYQRPYYLVSHIASVLRAINKGANVKGYLHWSLVDNYEWALGFSPKFGLIGYDENK
PtBGAL	401	ADSIDRLRPRYLVSIIKSVEKALSMGMDIRGYLHWSLIDNYEWASGFSMKFGLYGLDLNN
FnGHFP	373	ADSKDKYRSLFIISHLYAIEKALNEGIPIKGYLHWSIDNFEWAKGYSKRFGLAYTDLST

gPfuBGL	437	KKRYLRPSALVFREIATQKEIPEELAHLADLKVFVTRK---
ThAggBGY	450	KKRYLRPSALVFREIATHNGIPDELQHLTLIQ-----
CmGHFP	452	KRRYFRPSALVMREVAQKKAIPDYLEHYIKPPRIE-----
SaBGAL	453	KRLYWRPSALVYREITRSNGIPEELEHLNRVPPIKPLRH
SsoBGAL	451	KRLYWRPSALVYREIATNGAITDEIEHLNSVPPVKPLRH
TvBGAL	444	K-LYWRPSALVYKEIATKNCISPELKHLDSPPIINGLRK
PtBGAL	461	KKIQhrPSALVFKEIANANGVPEEFEMADQHQS-----
FnGHFP	433	KKYIPRPSMYIFREIKDKSIDKFKGYDPYNLMKF-----

Fig. 3

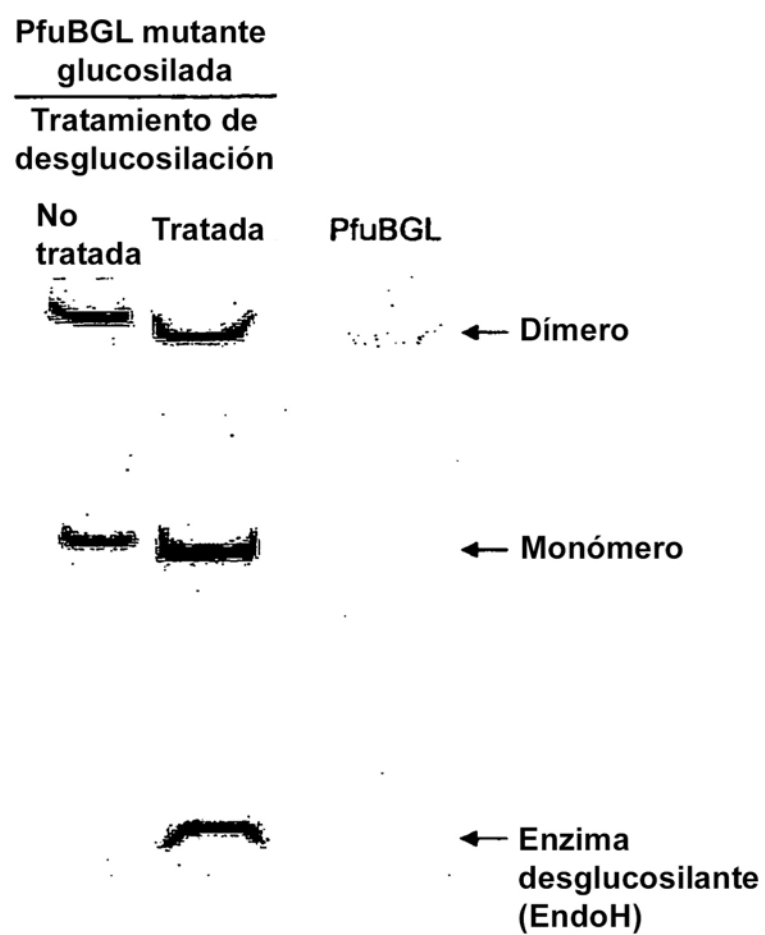


Fig. 4

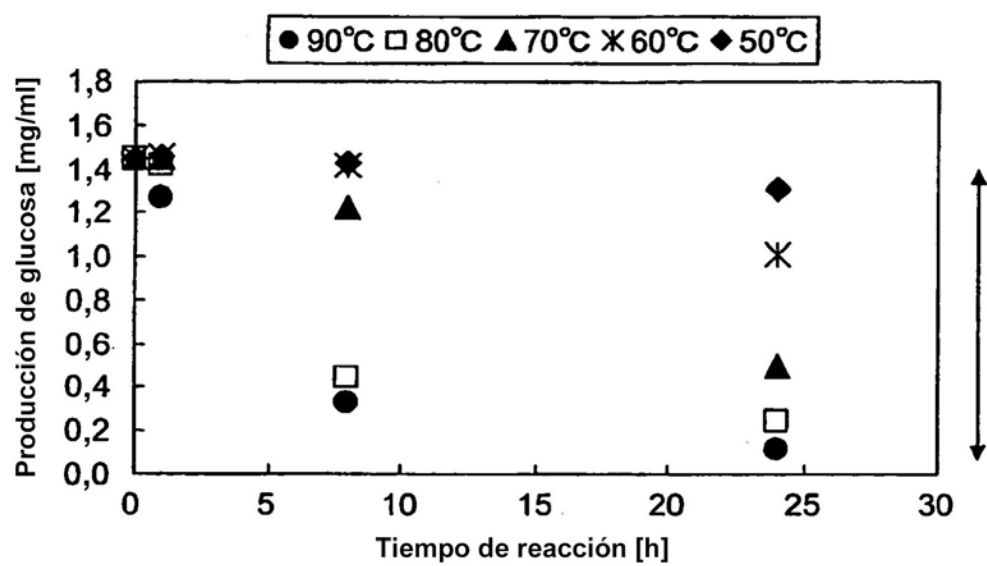


Fig. 5

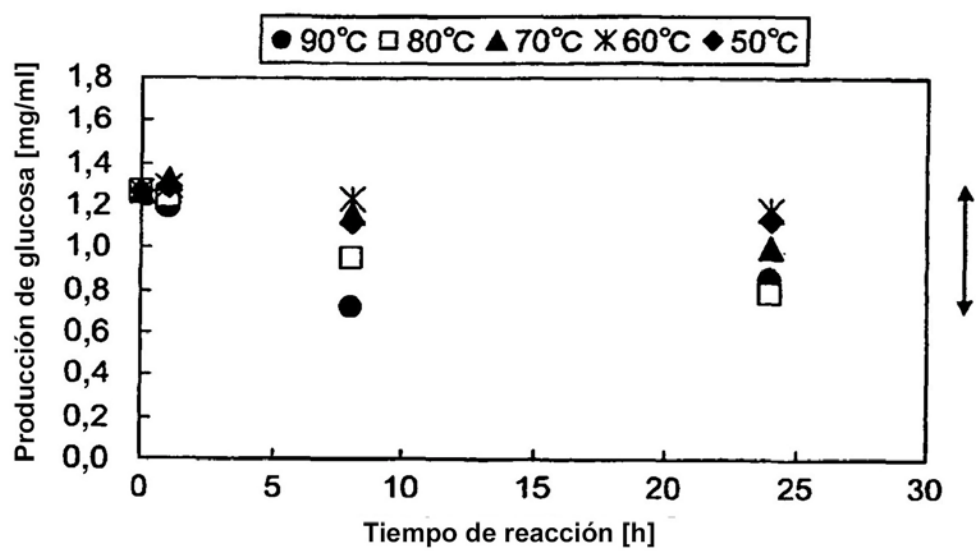


Fig. 6

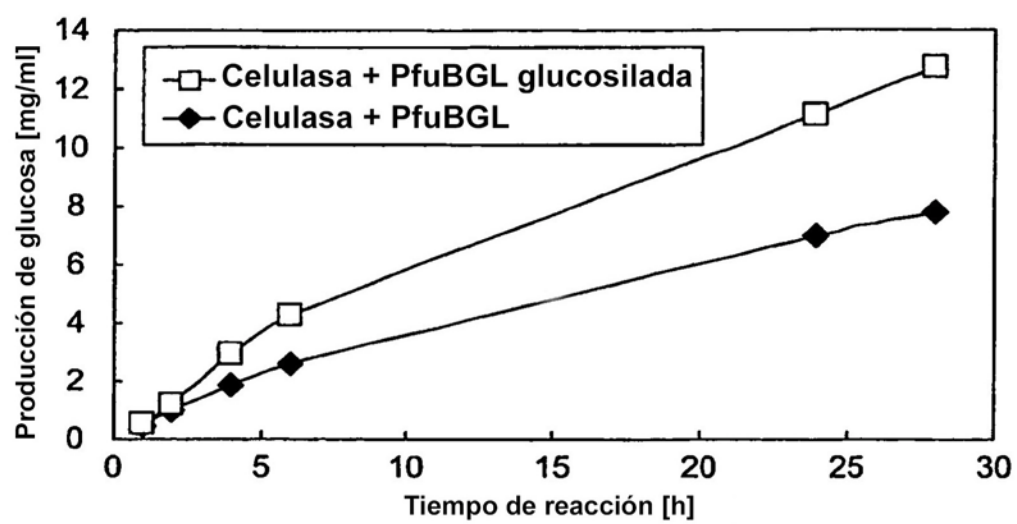


Fig. 7

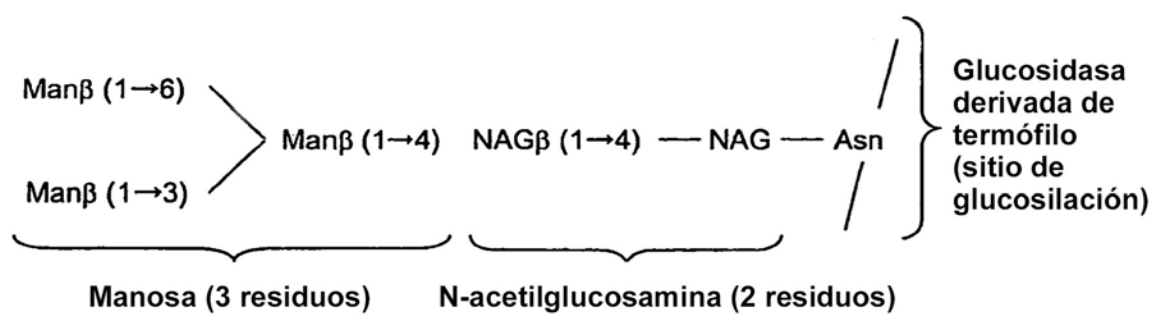


Fig. 8

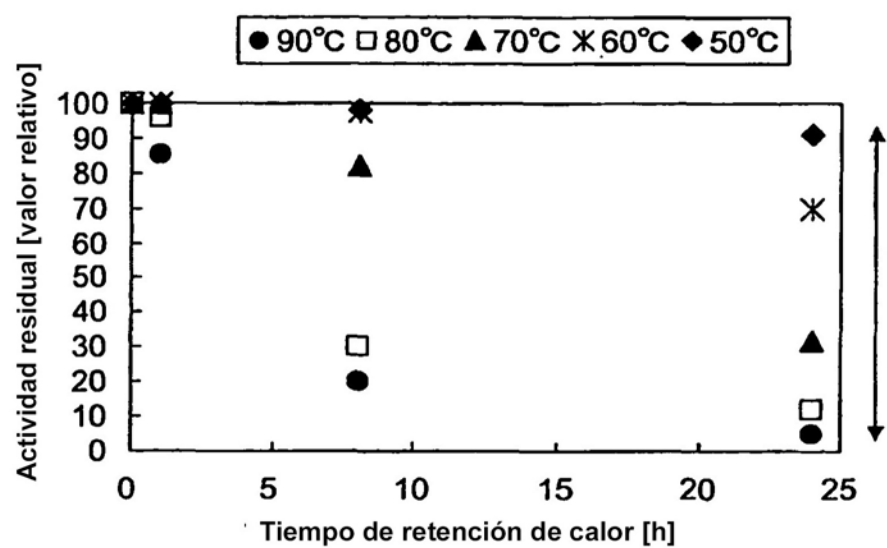


Fig. 9

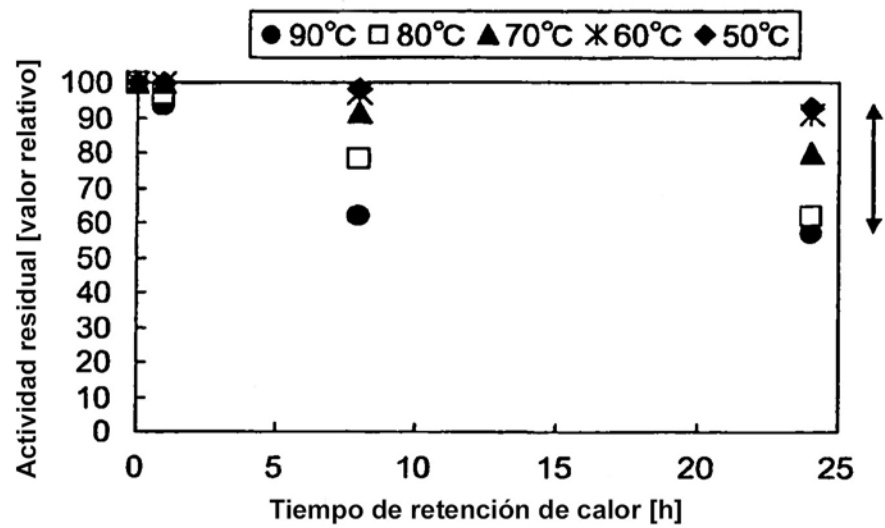


Fig. 10

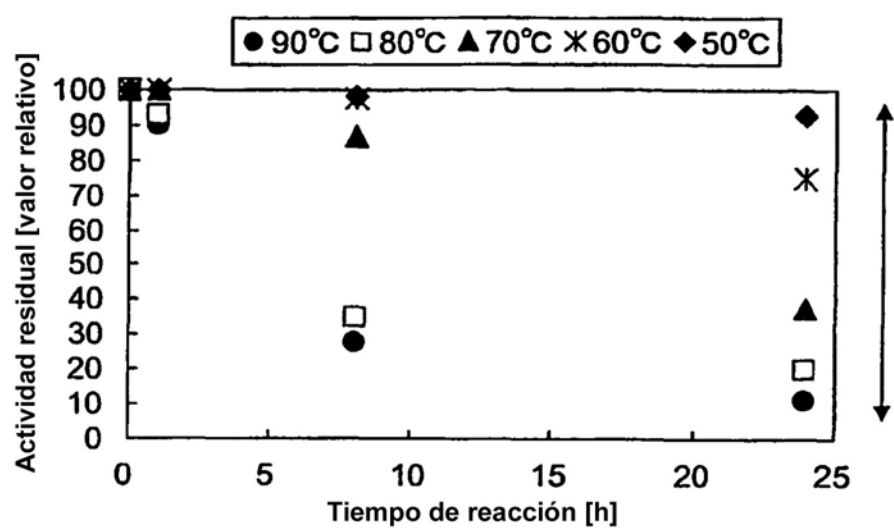


Fig. 11

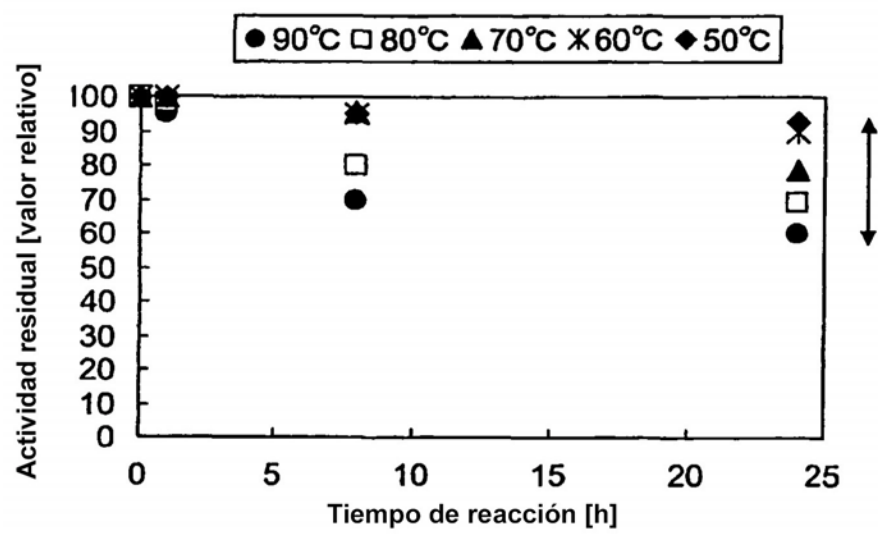


Fig. 12

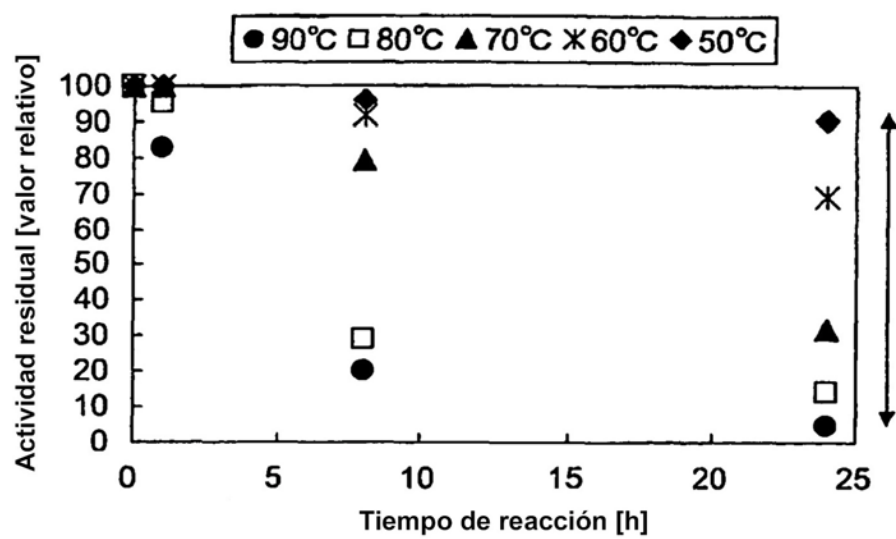


Fig. 13

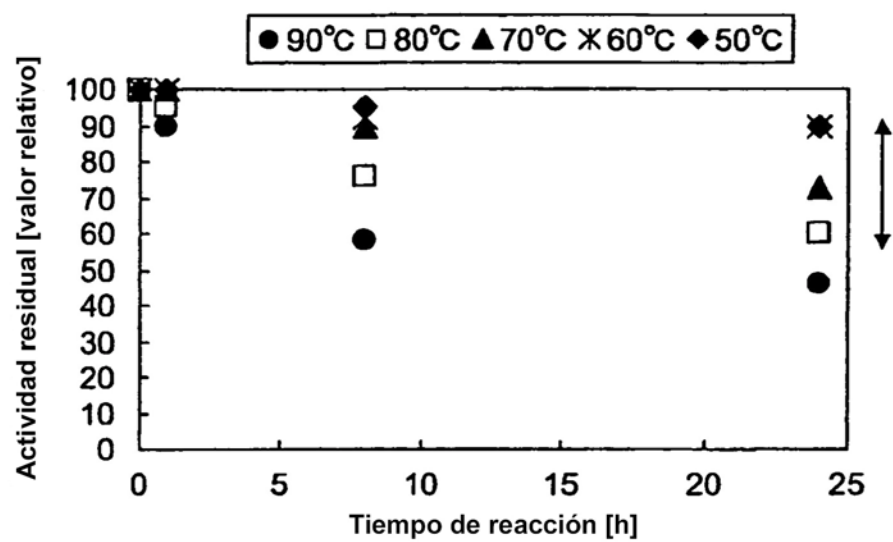


Fig. 14

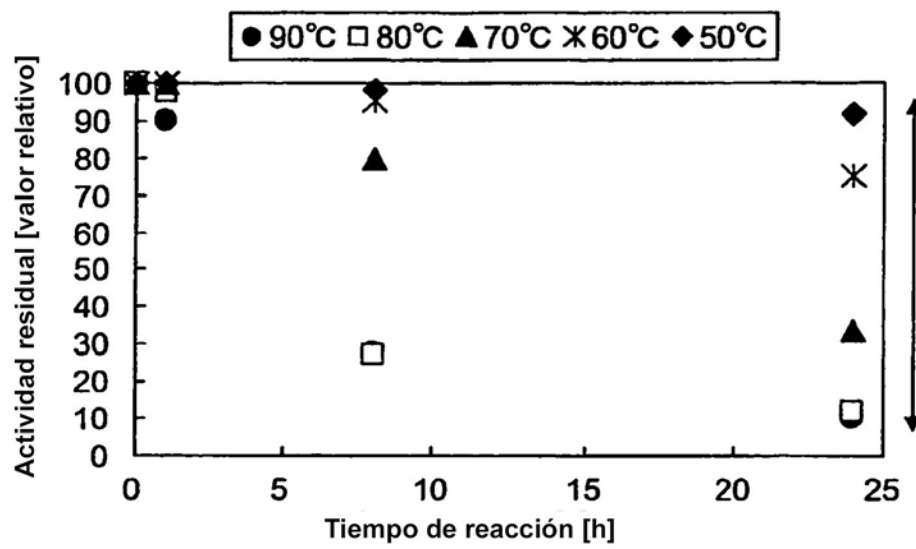


Fig. 15

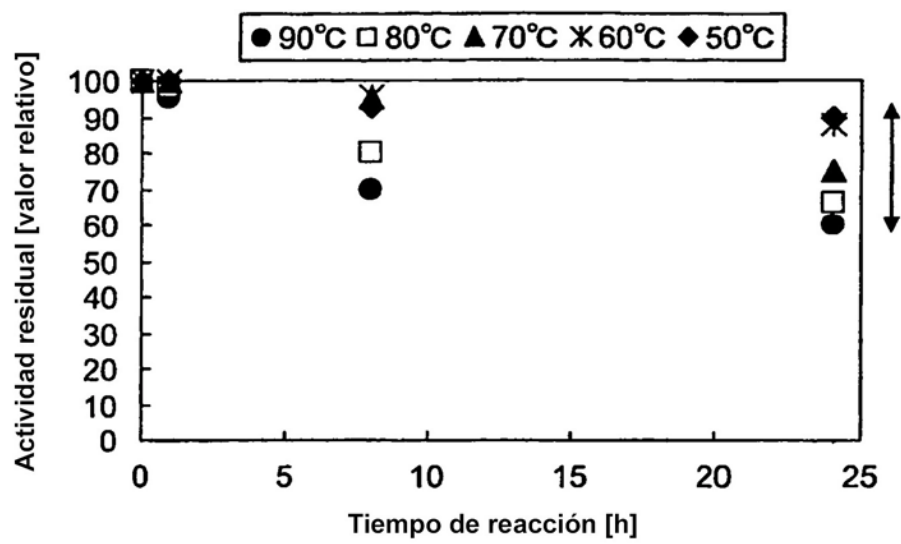


Fig. 16

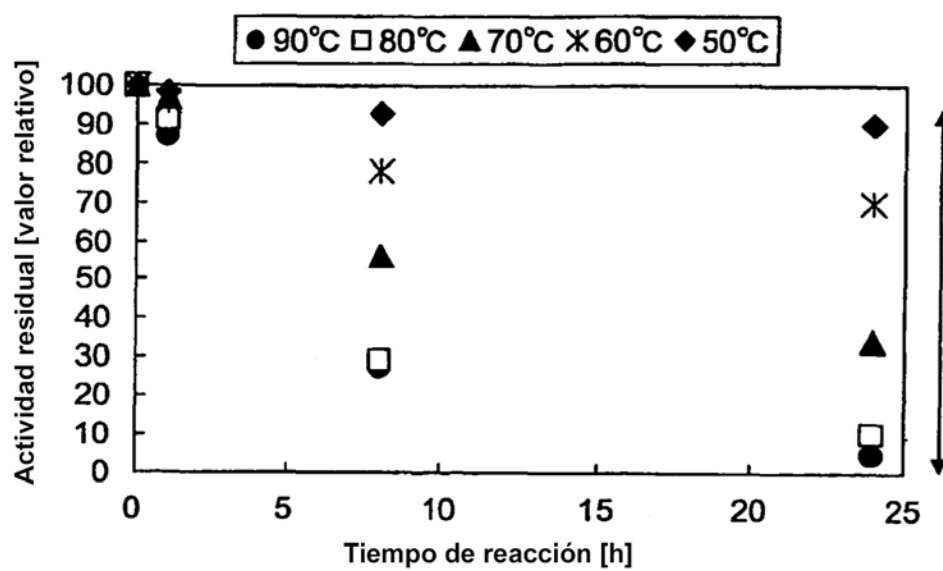


Fig. 17

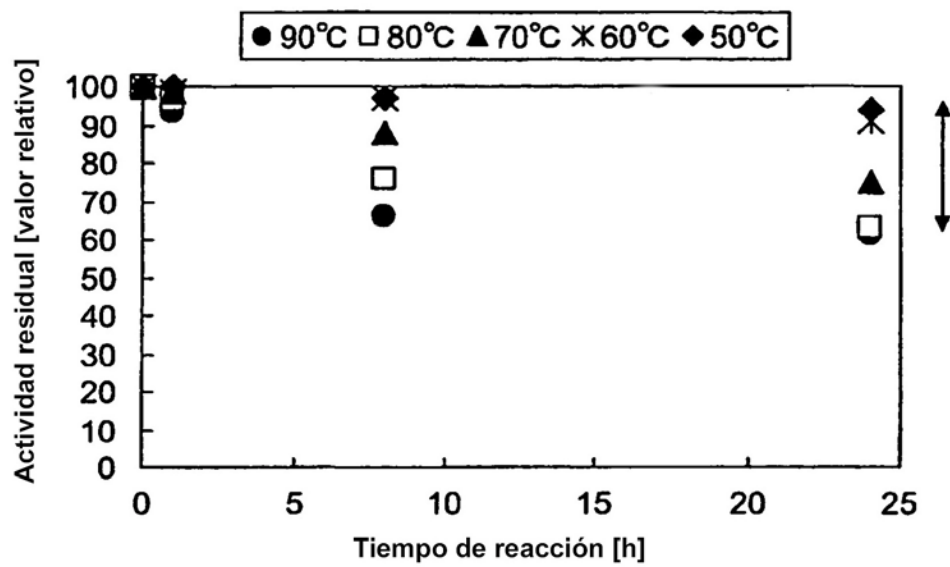


Fig. 18

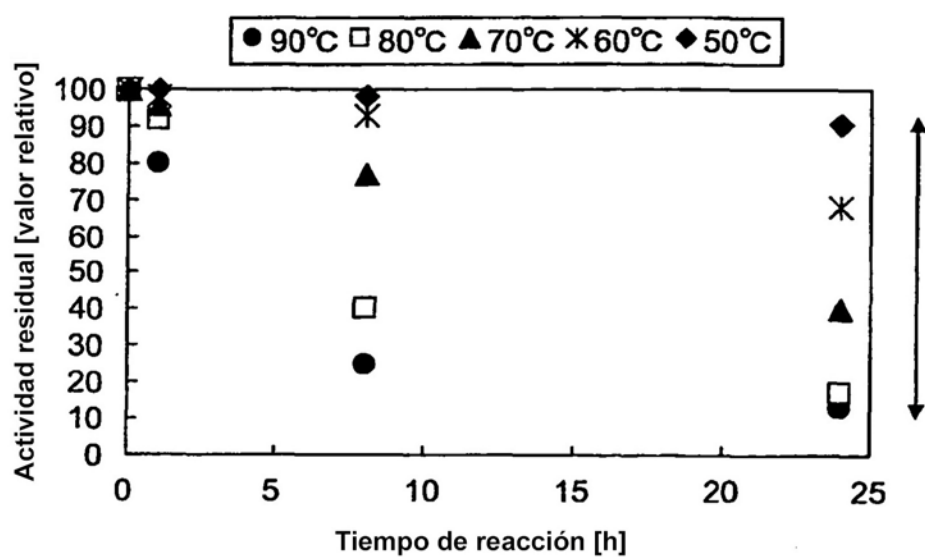


Fig. 19

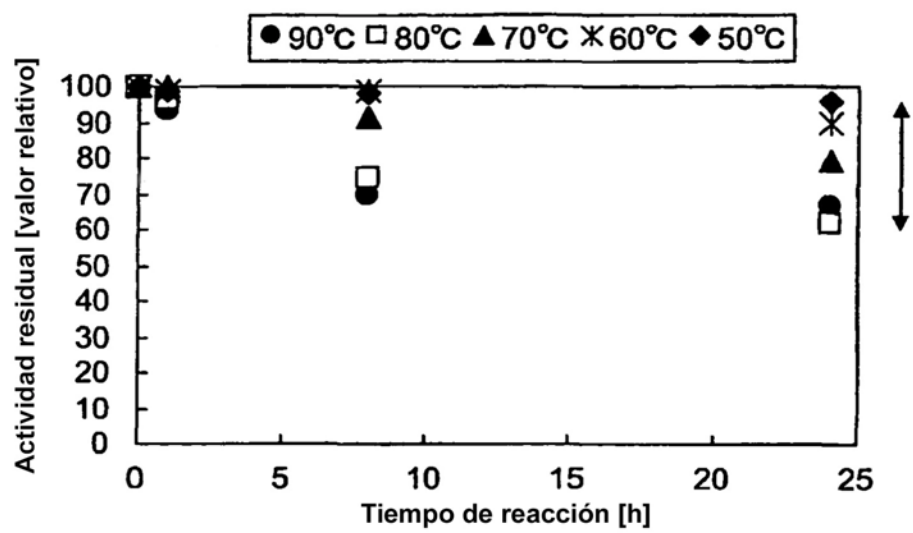


Fig. 20

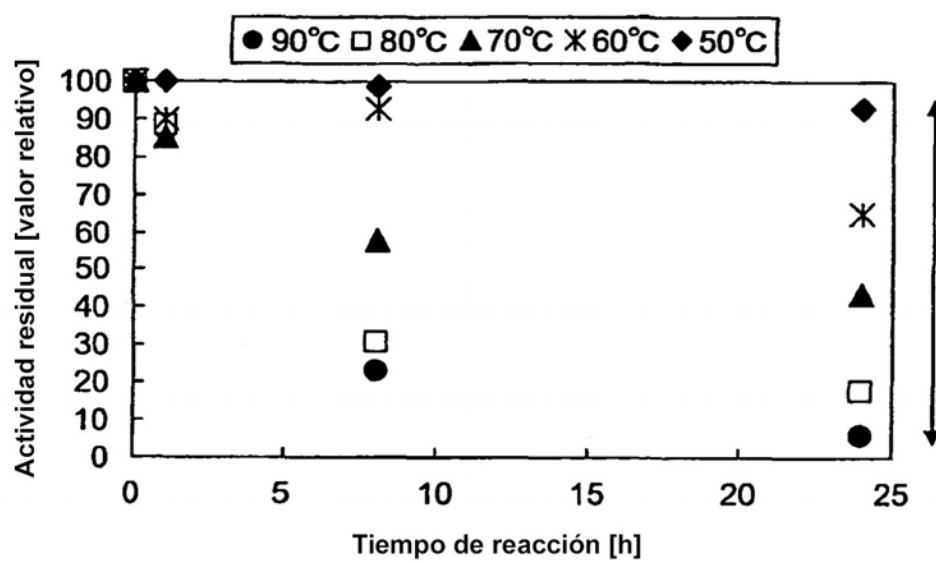


Fig. 21

