

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 528**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

D21C 5/00 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2011 PCT/US2011/054034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO12044835**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2011 E 11767878 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2622068**

54 Título: **Variantes de polipéptidos con actividad de mejora celulolítica y polinucleótidos que las codifican**

30 Prioridad:

30.09.2010 US 388530 P

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

20.12.2016

73 Titular/es:

**NOVOZYMES, INC. (100.0%)
1445 Drew Avenue
Davis, CA 95618, US**

72 Inventor/es:

**SWEENEY, MATTHEW y
WOGULIS, MARK**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 594 528 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

Variantes de polipéptidos con actividad de mejora celulolítica y polinucleótidos que las codifican

5 [0001] Esta invención fue realizada con apoyo gubernamental bajo Acuerdo Cooperativo DE-FC36-08GO18080 otorgado por el Departamento de Energía. El gobierno tiene derechos sobre esta invención.

Referencia a un listado de secuencias

10 [0002] Esta patente contiene un listado de secuencias.

Antecedentes de la invención

15 **Campo de la invención**

[0003] La presente invención se refiere a polipéptidos con variantes que tienen actividad de mejora celulolítica, polinucleótidos que codifican las variantes, métodos de producción de las variantes, y métodos de uso de las variantes.

20 **Descripción de las técnicas relacionadas**

[0004] La celulosa es un polímero de la glucosa de azúcar simple enlazado de manera covalente por enlaces beta-1,4.

25 Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan glucanos beta-enlazados. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas. Endoglucanasas digieren el polímero de celulosa en ubicaciones al azar, abriéndolo al ataque por celobiohidrolasas. Las celobiohidrolasas consecutivamente liberan moléculas de celobiosa de las extremidades del polímero de celulosa.

30 La celobiosa es un dímero de glucosa hidrosoluble enlazado en beta-1,4. Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa para dar glucosa.

[0005] La conversión de materias primas lignocelulósicas en etanol tiene las ventajas de la disponibilidad preparada de cantidades grandes de materia prima, la conveniencia de evitar la combustión o vertido de los materiales, y la limpieza del combustible de etanol.

35 Madera, residuos agrícolas, cultivos herbáceos, y residuos sólidos municipales han sido considerados como materias primas para la producción de etanol. Estos materiales principalmente consisten en celulosa, hemicelulosa, y lignina. Una vez la lignocelulosa se convierte en azúcares fermentables, por ejemplo, glucosa, los azúcares fermentables son fácilmente fermentados por levadura en etanol.

[0006] WO 2005/074647, WO 2008/148131, WO 2011/035027 revelan polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Thielavia terrestris*.

45 WO 2005/074656 y WO 2010/065830 revelan polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Thermoascus aurantiacus*.

WO 2007/089290 divulga un polipéptido GH61 aislado que tiene actividad de mejora celulolítica y su polinucleótido de *Trichoderma reesei*.

50 WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, y WO 2009/085868 revelan polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Myceliophthora thermophila*.

WO 2010/138754 divulga polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Aspergillus fumigatus*.

55 WO 2011/005867 divulga polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Penicillium pinophilum*.

WO 2011/039319 divulga polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Thermoascus sp.*

60 WO 2011/041397 divulga polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Penicillium sp.*

WO 2011/041504 divulga polipéptidos GH61 aislados que tienen actividad de mejora celulolítica y sus polinucleótidos de *Thermoascus crustaceus*.

65 WO 2008/151043 divulga métodos para aumentar la actividad de un polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica añadiendo un catión metálico bivalente de activación soluble a una composición que comprende el polipéptido.

[0007] Sería ventajoso en la técnica mejorar la capacidad de los polipéptidos que tienen actividad de mejora celulolítica para mejorar la degradación enzimática de materias primas lignocelulósicas.

[0008] La presente invención proporciona variantes de un polipéptido con actividad de mejora celulolítica con propiedades mejoradas.

Resumen de la invención

[0009] La presente invención se refiere a variantes, que comprenden sustituciones L90V + D131S + M134L del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, donde la variante tiene actividad de mejora celulolítica y la variante es seleccionada del grupo consistente en:

(a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADNc de la misma.

[0010] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las variantes; constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped comprendiendo los polinucleótidos; y métodos de producción de las variantes.

[0011] La presente invención también se refiere a métodos para la degradación o conversión de un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia de tal variante que tiene actividad de mejora celulolítica.

[0012] La presente invención también se refiere a métodos para producir un producto de fermentación, que comprende:

(a) sacarificación de un material celulósico con una composición enzimática en presencia de tal variante que tiene actividad de mejora celulolítica;

(b) fermentación del material celulósico sacarificado con uno o más (por ejemplo; varios) microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y

(c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

[0013] La presente invención también se refiere a métodos de fermentación de un material celulósico, que comprende: fermentar el material celulósico con uno o más (por ejemplo; varios) microorganismos fermentadores, donde el material celulósico se sacarifica con una composición enzimática en presencia de tal variante que tiene actividad de mejora celulolítica.

Breve descripción de las figuras

[0014]

La Figura 1 muestra la conversión de celulosa hinchada de ácido fosfórico (0.5% p/p) por la combinación de pirogalol y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus*; la combinación de pirogalol, polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus*, y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus*; y la combinación de pirogalol, variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. fumigatus*, y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus*.

Figuras 2A y 2B muestran el efecto del polipéptido GH61 B de tipo salvaje de *A. fumigatus* y la variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. fumigatus* en la conversión de rastrojos de maíz pretratados (PCS) por la combinación de una composición de celulasa de *Trichoderma reesei* y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* a bien 50°C o 55°C.

Figuras 3A (0.45 mg/g GH61) y 3B (0.75 mg/g GH61) muestran el efecto del polipéptido GH61 B de tipo salvaje de *A. fumigatus* y variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61 B de *A. fumigatus* en la conversión de PCS por la combinación de una composición de celulasa de alta temperatura y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* a 50°C, 55°C, 60°C, o 65°C.

Definiciones

[0015] **Acetilxilano esterasa:** el término "acetilxilano esterasa" significa una carboxilesterasa (EC 3.1.1.72) que cataliza la hidrólisis de grupos de acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, alfa-naftil acetato, y p-nitrofenil acetato.

Para fines de la presente invención, actividad de acetilxilano esterasa es determinada usando 0.5 mM de p-nitrofenilacetato como sustrato en 50 mM de acetato sódico pH 5.0 conteniendo 0.01% TWEEN™ 20 (polioxietileno sorbitán monolaurato).

Una unidad de acetilxilano esterasa es definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de anión de p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0016] **Variante alélica:** el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico.

Variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de las poblaciones.

Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos teniendo secuencias de aminoácidos alteradas.

Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0017] **Alfa-L-arabinofuranosidasa:** el término "alfa-L-arabinofuranosidasa" significa una alfa-L-arabinofuranósido arabinofuranohidrolasa (EC 3.2.1.55) que cataliza la hidrólisis de residuos de alfa-L-arabinofuranósido terminales no reductores en alfa-L-arabinósidos.

La enzima actúa en alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contienen enlaces (1,3) y/o (1,5), arabinoxilanos, y arabinogalactanos.

Alfa-L-arabinofuranosidasa es también conocida como arabinosidasa, alfa-arabinosidasa, alfa-L-arabinosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa polisacárida, alfa-L-arabinofuranósido hidrolasa, L-arabinosidasa, o alfa-L-arabinanasa.

Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa es determinada usando 5 mg de arabinoxilano de trigo de viscosidad media (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Irlanda) por ml de 100 mM de acetato sódico pH 5 en un volumen total de 200 µl durante 30 minutos a 40°C seguido de análisis de arabinosa por cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

[0018] **Alfa-glucuronidasa:** el término "alfa-glucuronidasa" significa una alfa-D-glucosiduronato glucuronohidrolasa (EC 3.2.1.139) que cataliza la hidrólisis de un alfa-D-glucuronósido en D-glucuronato y un alcohol.

Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-glucuronidasa se determina según de Vries, 1998, J. Bacteriol. 180: 243-249.

Una unidad de alfa-glucuronidasa equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico por minuto a pH 5, 40°C.

[0019] **Beta-glucosidasa:** el término "beta-glucosidasa" significa una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no reductores terminales con la liberación de beta-D-glucosa.

Para fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa es determinada usando el p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato según el procedimiento de Venturi et al., 2002, Extracellular beta-D-glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum*: production, purification and some biochemical properties, J. Basic Microbiol. 42: 55-66.

Una unidad de beta-glucosidasa es definida como 1.0 µmol de anión de p-nitrofenolato producido por minuto a 25°C, pH 4.8 de 1 mM de p-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato en 50 mM de citrato sódico conteniendo 0,01% de TWEEN® 20.

[0020] **Beta-xilosidasa:** el término "beta-xilosidasa" significa una beta-D-xilósido xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exohidrólisis de beta (1→4)-xilooligosacáridos, para eliminar residuos de D-xilosa sucesivos de terminales no reductores.

Para fines de la presente invención, una unidad de beta-xilosidasa es definida como 1.0 µmol de anión de p-nitrofenolato producido por minuto a 40°C, pH 5 de 1 mM p-nitrofenil-beta-D-xilósido como sustrato en 100 mM de citrato sódico conteniendo 0.01% TWEEN® 20.

[0021] **ADNc:** el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm, madura, empalmada, obtenida de una célula eucariótica o procariótica. ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente.

El transcrito de ARN inicial primario es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

[0022] **Celobiohidrolasa:** el término "celobiohidrolasa" significa una 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (E.C. 3,2,1,91) que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier polímero que contiene glucosa enlazada en beta-1,4, que libera celobiosa de las extremidades reductoras o no reductoras de la cadena (Teeri, 1997, Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology 15: 160-167; Teeri et al., 1998, Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178).

Actividad de celobiohidrolasa se determina según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters, 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeysens, 1985, FEBS Letters, 187: 283-288; and Tomme et al., 1988, Eur. J. Biochem. 170: 575-581.

En la presente invención, el método Tomme et al. puede utilizarse para determinar la actividad de celobiohidrolasa.

[0023] **Material celulósico:** el término "material celulósico" significa cualquier material que contiene celulosa.

El polisacárido predominante en la pared celular primaria de biomasa es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa, y el tercero es pectina.

La pared celular secundaria, producida después de que la célula ha dejado de crecer, también contiene polisacáridos y es reforzada por lignina polimérica reticulada de manera covalente a hemicelulosa.

La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y por tanto un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras las hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos, y mananos en estructuras ramificadas complejas con un espectro de sustituyentes.

Aunque generalmente es polimorfa, la celulosa se encuentra en el tejido vegetal principalmente como una matriz

cristalina insoluble de cadenas de glucano paralelas.

En las hemicelulosas normalmente el hidrógeno se une a celulosa, al igual que a otras hemicelulosas, ayudando a estabilizar la matriz de pared celular.

5 [0024] La celulosa generalmente se encuentra, por ejemplo, en los tallos, hojas, vainas, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de árboles.

El material celulósico puede ser, pero no está limitado a, residuo agrícola, material herbáceo (incluyendo cultivos de energía), residuos sólidos municipales, residuo de fábrica de pulpa y de papel, residuos de papel, y madera (incluyendo residuo de silvicultura) (ver, por ejemplo, Wiselogel et al., 1995, en Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), págs.105-118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, en Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, editor gerente, Volumen 65, págs.23-40, Springer-Verlag, New York).

10 Se entiende aquí que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.

15 En un aspecto preferido, el material celulósico es cualquier material de biomasa.

En otro aspecto preferido, el material celulósico es lignocelulosa, que comprende celulosa, hemicelulosas, y lignina.

[0025] En un aspecto, el material celulósico es residuo agrícola.

20 En otro aspecto, el material celulósico es material herbáceo (incluyendo plantas energéticas).

En otro aspecto, el material celulósico es residuos sólidos municipales.

En otro aspecto, el material celulósico es residuo de fábrica de papel.

En otro aspecto, el material celulósico es residuo de papel.

En otro aspecto, el material celulósico es madera (incluyendo residuo forestal).

25

[0026] En otro aspecto, el material celulósico es arundo.

En otro aspecto, el material celulósico es bagazo.

En otro aspecto, el material celulósico es bambú.

En otro aspecto, el material celulósico es mazorca de maíz.

30 En otro aspecto, el material celulósico es fibra de maíz.

En otro aspecto, el material celulósico es rastrojo de maíz.

En otro aspecto, el material celulósico es miscanthus.

En otro aspecto, el material celulósico es piel de naranja.

En otro aspecto, el material celulósico es paja de arroz.

35 En otro aspecto, el material celulósico es pasto varilla.

En otro aspecto, el material celulósico es paja de trigo.

[0027] En otro aspecto, el material celulósico es álamo.

En otro aspecto, el material celulósico es eucaliptus.

40 En otro aspecto, el material celulósico es abeto.

En otro aspecto, el material celulósico es pino.

En otro aspecto, el material celulósico es álamo.

En otro aspecto, el material celulósico es picea.

En otro aspecto, el material celulósico es sauce.

45

[0028] En otro aspecto, el material celulósico es celulosa algal.

En otro aspecto, el material celulósico es celulosa bacteriana.

En otro aspecto, el material celulósico es pelusa de algodón.

En otro aspecto, el material celulósico es papel de filtro.

50 En otro aspecto, el material celulósico es celulosa microcristalina.

En otro aspecto, el material celulósico es celulosa tratada con ácido fosfórico.

[0029] En otro aspecto, el material celulósico es una biomasa acuática.

55 Como se utiliza en este caso el término "biomasa acuática" significa biomasa producida en un ambiente acuático por un proceso de fotosíntesis.

La biomasa acuática puede ser algas, plantas emergentes, plantas de hoja flotante, o plantas sumergidas.

[0030] El material celulósico se puede utilizar porque se somete o se puede someter a pretratamiento, usando métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en este caso.

60 En un aspecto preferido, el material celulósico es pretratado.

[0031] **Enzima celulolítica o celulasa:** el término "enzima celulolítica" o "celulasa" significa una o más (por ejemplo; varias) enzimas que hidrolizan un material celulósico.

Tales enzimas incluyen endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s), beta-glucosidasa(s), o combinaciones de las mismas.

65 Los dos métodos básicos para medir actividad celulolítica incluyen: (1) medición de la actividad celulolítica total, y (2) medición de las actividades celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas) como

se revisa en Zhang et al., Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481.

La actividad celulolítica total es normalmente medida usando sustratos insolubles, incluyendo papel de filtro N°1 de Whatman, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa algal, algodón, lignocelulosa pretratada, etc. El ensayo de actividad celulolítica total más común es el ensayo de papel de filtro que usa papel de filtro N°1 de Whatman como sustrato.

El ensayo fue establecido por la Unión Internacional de Química Aplicada y Pura (IUPAC, por sus siglas en inglés) (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

[0032] Para fines de la presente invención, la actividad enzimática celulolítica se determina por la medición del aumento en la hidrólisis de un material celulósico por enzima(s) celulolítica(s) bajo las condiciones siguientes: 1-50 mg de proteína de enzima celulolítica/g de celulosa en PCS (u otro material celulósico pretratado) durante 3-7 días a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína enzimática celulolítica.

Condiciones típicas son reacciones de 1 ml, PCS lavado o sin lavar, 5% de sólidos insolubles, 50 mM pH de acetato sódico 5,1 mM de MnSO₄, 50°C, 55°C, o 60°C, 72 horas, análisis de azúcar por columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA USA).

[0033] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante.

Los límites de la secuencia codificante son generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como, ATG, GTG o TTG y termina con un codón de parada tal como, TAA, TAG, o TGA.

La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

[0034] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" significa secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención.

Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o foránea (es decir, de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante o nativa o foránea entre sí.

Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción.

Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional.

Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlazadores para el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

[0035] **Endoglucanasa:** el término "endoglucanasa" significa una endo-1,4-(1,3,1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.4) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados químicos de la celulosa (tal como carboximetilcelulosa y hidroxietil celulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 mezclados en beta-1,3 glucanos tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal que contiene componentes celulósicos.

La actividad de endoglucanasa se puede determinar midiendo la reducción en la viscosidad de sustrato o aumento en extremidades reductoras determinadas por un ensayo de azúcar reductor (Zhang et al., 2006, avances de biotecnología 24: 452-481).

Para fines de la presente invención, la actividad de endoglucanasa es determinada usando la carboximetil celulosa (CMC) como sustrato según el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268, a pH 5, 40°C.

[0036] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una variante incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0037] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y es operativamente enlazado a secuencias de control que proporcionan su expresión.

[0038] **Glicósido hidrolasa de familia 61:** el término "glicósido hidrolasa de Familia 61" o "Familia GH61" o "GH61" significa un polipéptido que cae en la glicósido hidrolasa de Familia 61 según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat B., and Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

Las enzimas en esta familia fueron originalmente clasificadas como una familia glicósido hidrolasa con base en la medición de la actividad endo-1,4-beta-D-glucanasa muy débil en un miembro de la familia.

La estructura y modo de acción de estas enzimas son no canónicas y no se pueden considerar como glicosidasas auténticas.

Sin embargo, se mantienen en la clasificación CAZy basándose en su capacidad para mejorar la descomposición de lignocelulosa cuando se usan conjuntamente con una celulasa o una mezcla de celulasas.

[0039] **Feruloil esterasa:** el término "feruloil esterasa" significa una hidrolasa de 4-hidroxi-3-metoxicinamoil-azúcar (EC 3.1.1.73) que cataliza la hidrólisis de grupos 4-hidroxi-3-metoxicinamoilo (feruloilo) de azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en los sustratos de biomasa natural, para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato).

Feruloil esterasa es también conocida como esterasa de ácido ferúlico, esterasa de hidroxicinamoilo, FAE-III, hidrolasa de éster de cinamoilo, FAEA, cinnAE, FAE-I, o FAE-II.

Para fines de la presente invención, actividad feruloil esterasa es determinada usando 0.5 mM de p-nitrofenilferulato como sustrato en 50 mM de acetato sódico pH 5.0.

Una unidad de feruloil esterasa equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de anión de p-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0040] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo; varios) aminoácidos ausentes del término amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de mejora celulolítica.

En un aspecto, un fragmento contiene al menos 200 residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos 210 residuos de aminoácidos o al menos 220 residuos de aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

[0041] **Enzima hemicelulolítica o hemicelulasa:** el término "enzima hemicelulolítica" o "hemicelulasa" significa una o más (por ejemplo; varias) enzimas que hidrolizan un material hemicelulósico.

Ver, por ejemplo, Shallom, D. y Shoham, Y. Microbial hemicellulases. Current Opinion In Microbiology, 2003, 6(3): 219-228).

Hemicelulasas son componentes clave en la degradación de biomasa vegetal.

Ejemplos de hemicelulasas incluyen, pero de forma no limitativa, una esterasa de acetilmanano, una acetilxilano esterasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una glucuronoil esterasa, una mananasa, una manosidasa, una xilanasas, y una xilosidasa.

Los sustratos de estas enzimas, las hemicelulosas, son un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados y lineales que son ligados vía enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa en la pared celular vegetal, reticulándolos en una red robusta.

Hemicelulosas son también fijadas de manera covalente a lignina, formando junto con celulosa una estructura altamente compleja.

La estructura variable y organización de hemicelulosas requiere la acción convenida de muchas enzimas para su degradación completa.

Los módulos catalíticos de hemicelulasas son bien glicósido hidrolasas (GHs) que hidrolizan enlaces glicosídicos, o carbohidrato esterases (CEs), que hidrolizan enlaces de éster de acetato o grupos laterales de ácido ferúlico.

Estos módulos catalíticos, basados en homología de su secuencia primaria, se pueden asignar en las familias GH y CE.

Algunas familias, con un pliegue similar total, pueden ser además reagrupadas en clanes, marcadas alfabéticamente (por ejemplo, GH-A).

Una clasificación más informativa y actualizada de éstas y otras enzimas activas de carbohidrato está disponible en la base de datos de enzimas activas por carbohidratos (CAZy).

Actividades enzimáticas hemicelulolíticas se pueden medir según Ghose y Bisaria, 1987, Pure & Appl. Chem. 59: 1739-1752, a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, y pH, por ejemplo, 5.0 o 5.5.

[0042] **Condiciones de astringencia altas:** el término "condiciones de alta astringencia" se refiere a sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% de formamida, después de los procedimientos de Southern blot durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 65°C.

[0043] **Célula huésped:** el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción, o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0044] **Actividad térmica aumentada:** el término "actividad térmica aumentada" significa un perfil de actividad dependiente de la temperatura más alto o más amplio de una variante en comparación con el perfil de actividad dependiente de la temperatura del progenitor.

La actividad térmica aumentada de la variante mejora la catálisis de una reacción a una o más (por ejemplo; varias) temperaturas específicas con respecto al progenitor.

Una variante más termoactiva llevará a una reducción en el tiempo requerido y/o una reducción en la concentración enzimática requerida para catálisis de la reacción.

La actividad térmica aumentada de la variante con respecto al progenitor puede ser evaluada, por ejemplo, bajo condiciones de una o más (por ejemplo; varias) temperaturas.

Por ejemplo, las una o más (por ejemplo; varias) temperaturas pueden ser cualquiera en el rango de temperatura de

En otro aspecto, la actividad térmica del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 80°C.
 En otro aspecto, la actividad térmica del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 85°C.
 En otro aspecto, la actividad térmica del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 90°C.

- 5 [0056] La actividad térmica aumentada de la variante con respecto al original se puede determinar utilizando cualquier ensayo enzimático conocido en la técnica para polipéptidos GH61 que tienen actividad de mejora celulolítica.
 Ver por ejemplo, WO 2005/074647, WO 2008/148131 WO 2005/074656, WO0, WO 2007/089290, WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868, y WO 2008/151043.
- 10 Alternativamente, la actividad térmica aumentada de la variante con respecto al original se puede determinar utilizando cualquier ensayo de aplicación para la variante donde el rendimiento de la variante es comparado con el progenitor.
 Por ejemplo, el ensayo de aplicación descrito en ejemplo 12 o 14 puede ser usado.
- 15 [0057] En un aspecto, la actividad térmica de la variante es al menos 1.01 veces, por ejemplo, al menos 1.05 veces, al menos 1.1 veces, al menos 1.5 veces, al menos 1.8 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, y al menos 50 veces más térmicamente activa que el progenitor.
- 20 [0058] Una variante con actividad térmica aumentada puede o no puede mostrar termoestabilidad aumentada con respecto al progenitor.
 Por ejemplo, una variante puede tener una actividad térmica mejorada con respecto al progenitor, pero no tiene termoestabilidad aumentada.
- 25 [0059] **Termoestabilidad aumentada:** el término "termoestabilidad aumentada" significa una retención más alta de actividad de mejora celulolítica de una variante después de un periodo de incubación a una temperatura con respecto al progenitor.
 La termoestabilidad aumentada de la variante con respecto al progenitor puede ser evaluada, por ejemplo, bajo condiciones de una o más (por ejemplo; varias) temperaturas.
- 30 Por ejemplo, la una o más (por ejemplo; varias) temperaturas pueden ser cualquier en el rango de temperatura de 45°C a 95°C, por ejemplo, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o 95°C (o entre estas) a un pH en el rango de 3 a 8, por ejemplo, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, o 8.0, (o entre estos) durante un periodo adecuado de incubación, por ejemplo, 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, o 60 minutos, de manera que la variante retiene actividad residual.
- 35 [0060] En un aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 50°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 55°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 60°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 65°C.
- 40 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 70°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 75°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 80°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 85°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.0 y 90°C.
- 45 [0061] En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 50°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 55°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 60°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 65°C.
- 50 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 70°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 75°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 80°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 85°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 3.5 y 90°C.
- 55 [0062] En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 50°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 55°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 60°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 65°C.
- 60 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 70°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 75°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 80°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 85°C.
 En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.0 y 90°C.
- 65 [0063] En otro aspecto, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se determina a pH 4.5 y 50°C.

En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 7.5 y 85°C.
En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 7.5 y 90°C.

[0070] En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 50°C.

- 5 En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 55°C.
En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 60°C.
En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 65°C.
En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 70°C.
En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 75°C.
10 En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 80°C.
En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 85°C.
En otro aspecto, la termoestabilidad del variante con respecto al progenitor se determina a pH 8.0 y 90°C.

[0071] En cada uno de los aspectos anteriores, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se puede determinar incubando la variante y el progenitor durante 1 minuto.

- 15 En cada uno de los aspectos anteriores, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se puede determinar incubando la variante y el progenitor durante 5 minutos.
En cada uno de los aspectos anteriores, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se puede determinar incubando la variante y el progenitor durante 10 minutos.
20 En cada uno de los aspectos anteriores, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se puede determinar incubando la variante y el progenitor durante 15 minutos.
En cada uno de los aspectos anteriores, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se puede determinar incubando la variante y el progenitor durante 30 minutos.
En cada uno de los aspectos anteriores, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se puede determinar incubando la variante y el progenitor durante 45 minutos.
25 En cada uno de los aspectos anteriores, la termoestabilidad de la variante con respecto al progenitor se puede determinar incubando la variante y el progenitor durante 60 minutos.

[0072] La termoestabilidad aumentada de la variante con respecto al progenitor se puede determinar por calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando métodos estándar en la técnica (ver, por ejemplo, Sturtevant, 1987, Annual Review of Physical Chemistry 38: 463-488).

- 30 La termoestabilidad aumentada de la variante con respecto al progenitor puede también ser determinada utilizando cualquier ensayo enzimático conocido en la técnica para polipéptidos GH61 que tienen actividad de mejora celulolítica.
35 Ver por ejemplo, WO 2005/074647, WO 2008/148131 WO 2005/074656, WO 2010/065830, WO 2007/089290, WO 2009/085935, WO 2009/085859, WO 2009/085864, WO 2009/085868, y WO 2008/151043.
Alternativamente, la termoestabilidad aumentada de la variante con respecto al progenitor se puede determinar utilizando cualquier ensayo de aplicación para la variante donde el rendimiento de la variante es comparado con el progenitor.
40 Por ejemplo, el ensayo de aplicación descrito en ejemplo 12 o 14 puede ser usado.

[0073] En un aspecto, la termoestabilidad de la variante que tiene actividad de mejora celulolítica es al menos 1.01 veces, por ejemplo, al menos 1.05 veces, al menos 1.1 veces, al menos 1.5 veces, al menos 1.8 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, y al menos 50 veces más termoestable que el progenitor.

- 45 [0074] Una variante con termoestabilidad aumentada puede o no puede mostrar actividad térmica aumentada con respecto al progenitor.
Por ejemplo, una variante puede tener una capacidad mejorada para replegarse después de la incubación a una temperatura elevada con respecto al progenitor, pero no tiene actividad térmica aumentada.
50

[0075] **Aislado:** el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no ocurre en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no se origina de forma natural, (2) cualquier sustancia incluyendo, pero no limitado a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que es al menos parcialmente eliminado de uno o varios o todos los constituyentes de origen natural con el cual se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales está asociada de forma natural (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor asociado de forma natural al gen que codifica la sustancia).

- 60 Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

[0076] **Condiciones de astringencia baja:** el término "condiciones de astringencia baja" se refiere a sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25% de formamida, después de los procedimientos de Southern blot estándar durante 12 a 24 horas.

- 65

El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 50°C.

[0077] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 22 a 250 de SEC ID n.º: 2 basado en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 21 de SEC ID n.º: 2 son un péptido señal.

Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos de los polipéptidos maduros más diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresados por el mismo polinucleótido.

[0078] **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de mejora celulolítica.

En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es nucleótidos 64 a 859 de SEC ID n.º: 1 con base en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice nucleótidos 1 a 63 de SEC ID n.º: 1 codifica un péptido señal.

En otro aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 64 a 859 de SEC ID n.º: 1.

[0079] **Condiciones de astringencia media:** el término "condiciones de astringencia media" significa sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% de formamida, después de los procedimientos de Southern blot estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 55°C.

[0080] **Condiciones de astringencia media-alta:** el término "condiciones de astringencia media-alta" para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 35% de formamida, después de los procedimientos de Southern blot estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 60°C.

[0081] **Mutante:** el término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

[0082] **Constructo de ácidos nucleicos:** el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien mono o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos en cierto modo que de lo contrario no existirían en la naturaleza o que es sintético, que comprende una o varias secuencias de control.

[0083] **Operativamente enlazado:** el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de un polinucleótido tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0084] **Polipéptido progenitor o progenitor con actividad de mejora celulolítica:** el término "progenitor" o "polipéptido progenitor con actividad de mejora celulolítica parent polypeptide" significa un polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica al cual se le hace una alteración para producir las variantes de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido (tipo salvaje) de origen natural o una variante del mismo, o un fragmento del mismo.

[0085] **Polipéptido con actividad de mejora celulolítica:** el término "polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica" significa un polipéptido GH61 que cataliza la mejora de la hidrólisis de un material celulósico por la enzima que tiene actividad celulolítica.

Para fines de la presente invención, actividad de mejora celulolítica se determina midiendo el aumento en azúcares reductores o el aumento del total de celobiosa y glucosa desde la hidrólisis de un material celulósico por la enzima celulolítica bajo las condiciones siguientes: 1-50 mg de total proteína/g de celulosa en PCS, donde la proteína total está compuesta de 50-99.5% p/p de proteína enzimática celulolítica y 0.5-50% p/p de proteína de un polipéptido con actividad de mejora celulolítica durante 1-7 días a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, y pH, por ejemplo, 5.0 o 5.5, en comparación con una hidrólisis de control con carga de proteína total igual sin actividad de mejora celulolítica (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS).

En un aspecto preferido, una mezcla de CELLULCLAST® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) en presencia de 2-3% en peso de proteína total beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (recombinantemente producida en *Aspergillus oryzae* según WO 02/095014) o 2-3% en peso de proteína total de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (recombinantemente producida en *Aspergillus oryzae* como se describe en WO 2002/095014) de carga de proteína de celulasa se usa como la fuente de la actividad celulolítica.

- 5 [0086] Los polipéptidos GH61 que tienen actividad de mejora celulolítica mejoran la hidrólisis de un material celulósico catalizado por una enzima con actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis preferiblemente al menos 1.01 veces, por ejemplo, al menos 1.05 veces, al menos 1.10 veces, al menos 1.25 veces, al menos 1.5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces.
- 10 [0087] **Rastrojos de maíz pretratados:** el término "PCS" o "rastrojos de maíz pretratados" significa un material celulósico derivado de rastrojos de maíz por tratamiento con calor y ácido sulfúrico diluido, pretratamiento alcalino, o pretratamiento neutro.
- [0088] **Identidad de secuencia:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos está descrita por el parámetro "identidad de secuencia".
- 15 [0089] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos es determinada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0,5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y es calculado de la siguiente manera:
- 20 (residuos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento - número total de gaps en el alineamiento)
- 25 [0090] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos es determinada utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se implementa en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 3.0.0,5.0.0 o posterior.
- 30 Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y es calculado de la siguiente manera:
- 35 (Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento – Número total de gaps en el alineamiento)
- [0091] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" se refiere a un polinucleótido teniendo uno o más (por ejemplo; varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante de polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de mejora celulolítica.
- 40 En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 600 nucleótidos, por ejemplo, al menos 630 nucleótidos o al menos 660 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.
- [0092] **Variante:** el término "variante" se refiere a un polipéptido con actividad de mejora celulolítica que incluye una alteración, es decir, una delección, inserción, y/o eliminación, en una o más (por ejemplo; varias) posiciones.
- 45 Una sustitución significa reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de un aminoácido adyacente e inmediatamente después del aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de mejora celulolítica del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
- 50 [0093] **Condiciones de astringencia muy altas:** el término "condiciones de astringencia muy altas" se refiere a sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 50% de formamida, después de los procedimientos de Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 70°C.
- 55 [0094] **Condiciones de astringencia muy bajas:** el término "condiciones de astringencia muy baja" se refiere a sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25% de formamida, después de procedimientos estándar de Southern blot durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 45°C.
- 60 [0095] **Material que contiene xilano:** el término "material que contiene xilano" se refiere a cualquier material que comprende un polisacárido de pared celular vegetal con una estructura de residuos de xilosa enlazados en beta-(1-
- 65

4).

Xilanos de plantas terrestres son heteropolímeros que poseen una estructura de beta-(1-4)-D-xilopiranosas, que se ramifican por cadenas de carbohidratos cortas.

Comprenden ácido D-glucurónico o su éster de 4-O-metilo, L-arabinosa, y/o varios oligosacáridos, compuestos por D-xilosa, L-arabinosa, D- o L-galactosa, y D-glucosa.

5 Polisacáridos tipo xilano se pueden dividir en homoxilanos y heteroxilanos, que incluyen glucuronoxilanos, (arabino)glucuronoxilanos, (glucurono)arabinoxilanos, arabinoxilanos, y heteroxilanos complejos. Ver, por ejemplo, Ebringerova et al., 2005, Adv. Polym. Sci. 186: 1-67.

10 [0096] En los métodos de la presente invención, cualquier material que contiene xilano puede ser utilizado. En un aspecto preferido, el material que contiene xilano es lignocelulosa.

[0097] **Actividad degradadora de xilano o actividad xilanolítica:** el término "actividad degradadora de xilano" o "actividad xilanolítica" significa una actividad biológica que hidroliza material que contiene xilano.

15 Los dos métodos básicos para medir actividad xilanolítica incluyen: (1) medición de la actividad xilanolítica total, y (2) medición de las actividades xilanolíticas individuales (por ejemplo, endoxilanasas, beta-xilosidasas, arabinofuranosidasas, alfa-glucuronidasas, acetilxilano esterasas, feruloil esterasas, y alfa-glucuronil esterasas).

Progreso reciente en ensayos de enzimas xilanolíticas fue resumido en diferentes publicaciones incluyendo Biely y Puchard, Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes, 2006, Journal of the Science of Food and Agriculture 86(11): 1636-1647; Spanikova and Biely, 2006, Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by Schizopyllum commune, FEBS Letters 580(19): 4597-4601; Herrmann, Vrsanska, Jurickova, Hirsch, Biely, and Kubicek, 1997, The beta-D-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase, Biochemical Journal 321: 375-381.

25 [0098] La actividad degradadora de xilano total se puede medir por la determinación de los azúcares reductores formados de varios tipos de xilano, incluyendo, por ejemplo, xilanos de espelta de avena, de madera de haya, y de madera de alerce, o por determinación fotométrica de fragmentos teñidos por xilano liberados de varios xilanos teñidos de manera covalente.

El ensayo de actividad xilanolítica total más común se basa en la producción de azúcares reductores de glucuronoxilano de 4-O-metilo polimérico como se describe en Bailey, Biely, Poutanen, 1992, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, Journal of Biotechnology 23(3): 257-270.

30 Actividad de xilanasa puede también ser determinada con 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 0,01% TRITON® X-100 (4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol) y 200 mM de tampón de fosfato sódico pH 6 a 37°C.

35 Una unidad de actividad de xilanasa es definida como 1.0 µmol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6 de 0.2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 200 mM de tampón de fosfato sódico pH 6.

[0099] Para fines de la presente invención, actividad de degradación de xilano se determina midiendo el aumento en la hidrólisis de xilano de madera de abedul (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, MO, EE.UU) por enzima(s) degradadora(s) de xilano bajo las siguientes condiciones típicas: 1 ml reacciones, 5 mg/ml sustrato (sólidos totales), 5 mg de proteína xilanolítica/g de sustrato, 50 mM de acetato sódico pH 5, 50°C, 24 horas, análisis de azúcar usando el ensayo de hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico (PHBAH) como se describe por Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal. Biochem 47: 273-279.

45 [0100] **Xilanasa:** el término "xilanasa" significa una 1,4-beta-D-xilan-xilohidrolasa (E.C. 3,2,1,8) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.

Para fines de la presente invención, la actividad de xilanasa se determina con 0.2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 0.01% TRITON® X-100 y 200 mM de tampón de fosfato sódico pH 6 a 37°C.

50 Una unidad de actividad de xilanasa es definida como 1.0 µmol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6 de 0.2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 200 mM tampón de fosfato sódico pH 6.

[0101] **Polipéptido tipo salvaje:** el término "polipéptido tipo salvaje" significa un polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica expresado por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura, u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza.

55 Descripción detallada de la invención

[0102] La presente invención se refiere las variantes descritas en la reivindicación 1.

60 Convenios para designación de variantes

[0103] Para fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en SEC ID n.º: 2 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica.

65 La secuencia de aminoácidos de otro polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica se alinea con el polipéptido maduro descrito en SEC ID n.º: 2, y basado en el alineamiento, el número de posición de aminoácido que corresponde a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en SEC ID n.º: 2 es

determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior.

Los parámetros usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0.5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62).

[0104] La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otro polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica se puede determinar por un alineamiento de secuencias polipeptídicas múltiples usando diferentes programas informáticos incluyendo, pero no limitado a, MUSCLE (comparación de secuencias múltiples por log-esperanza; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh and Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh and Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900), y EMBOSS EMMA usando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), usando sus parámetros por defecto respectivos.

[0105] Cuando el otro polipéptido ha divergido del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 de manera que la comparación basada en secuencias tradicional no logra detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), otros algoritmos de comparación de pares de secuencias pueden ser usados.

Sensibilidad superior en la búsqueda basada en secuencias se puede lograr usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de (perfiles) de familias de polipéptidos para buscar bases de datos.

Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda de base de datos reiterativa y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402).

Sensibilidad incluso superior se puede conseguir si la familia o superfamilia para el polipéptido tiene uno o varios representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas.

Programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de disolución) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia buscada.

De forma similar, el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, puede utilizarse para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP.

Estos alineamientos pueden sucesivamente usarse para generar modelos de homología para el polipéptido, y tales modelos se pueden evaluar para exactitud usando una variedad de herramientas desarrolladas para tal fin.

[0106] Para proteínas de estructura conocida, diferentes herramientas y recursos están disponibles para la recuperación y generación de alineamientos estructurales.

Por ejemplo, las superfamilias SCOP de proteínas han sido estructuralmente alineadas, y aquellos alineamientos son accesibles y descargables.

Dos o más estructuras de proteínas se pueden alinear utilizando una variedad de algoritmos como la matriz de alineamiento de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos puede ser utilizada adicionalmente para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm y Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0107] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita abajo se adapta para facilidad de referencia.

La letra única aceptada por la IUPAC o abreviaturas de tres letras de aminoácidos es empleada.

[0108] Sustituciones.

Para una sustitución de aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido.

Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A".

Mutaciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411 Phe" o "G205R + S411 F", representando sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

[0109] Deleciones.

Para una eliminación de aminoácidos, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, *.

Por consiguiente, la eliminación de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*".

Deleciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

[0110] Inserciones.

Para una inserción de aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado.

Por consiguiente la inserción de lisina después de glicina en la posición 195 es designada "Gly195GlyLys" o "G195GK".

Una inserción de aminoácidos múltiples es designada [aminoácido original, posición, aminoácido original,

aminoácido insertado #1, aminoácido insertado #2 etc.].

Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

- 5 [0111] En tales casos el residuo(s) de aminoácido insertado se enumeran por la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido que precede al residuo(s) de aminoácido insertado. En el ejemplo anterior, la secuencia por tanto sería:

Progenitor:	Variante:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

- 10 [0112] Alteraciones múltiples.
Variantes que comprenden alteraciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" representando una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.
- 15 [0113] Alteraciones diferentes.
Donde alteraciones diferentes se pueden introducir en una posición, las alteraciones diferentes se separan por una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico.
Así, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las variantes siguientes:
- 20 "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly", y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Variantes

- 25 [0114] La presente invención proporciona variantes, que comprenden sustituciones L90V + D131S + M134L del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, donde la variante tiene actividad de mejora celulolítica y la variante es seleccionada del grupo consistente en:
(a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;
(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADNc de la misma.
- 30 [0115] En una forma de realización preferida la variante comprende o consiste en las sustituciones L90V + D131S + M134L+ A141W del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
- 35 [0116] En una forma de realización, la variante tiene al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
- 40 [0117] En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención es 1-4, tal como 1, 2, 3, o 4 sustituciones.
- [0118] En otro aspecto, el variante comprende o consiste en las sustituciones L90V + D131S + M134L del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
- 45 [0119] Las variantes de la presente invención pueden comprender además una alteración, por ejemplo, eliminación, inserción, y/o sustitución en una o más (por ejemplo; varias) otras posiciones.
- [0120] Los cambios de aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, que lo son las sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que no afectan significativamente al pliegue y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido de enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.
- 55 [0121] Ejemplos de sustituciones conservadoras son en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).
- 60 Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran una actividad específica se conocen en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, The Proteins, Academic Press, New York.

Sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

5 [0122] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos son alteradas.

Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similar.

10 [0123] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085).

En la técnica anterior, mutaciones de alanina única se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica para identificar residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula.

15 Ver también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708.

El sitio activo del polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como se determina por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo.

20 Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64.

La identidad de aminoácidos esenciales también puede ser inferida a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

25 [0124] Las variantes pueden consistir en 200 a 220 aminoácidos, por ejemplo, 205 a 220, 210 a 220, y 215 a 220 aminoácidos.

[0125] En una forma de realización, la variante ha aumentado la actividad térmica.

30 [0126] En una forma de realización, la variante ha aumentado la termoestabilidad.

[0127] En una forma de realización, la variante ha aumentado la actividad térmica y ha aumentado la termoestabilidad.

35 **Polipéptidos progenitores que tienen actividad de mejora celulolítica**

[0128] El polipéptido progenitor que tiene actividad de mejora celulolítica puede ser (a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 o (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad de secuencia a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADNc de la misma.

40 [0129] En un aspecto, el original tiene una identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 de al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad de mejora celulolítica.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos, del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

50 [0130] En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2.

En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en los aminoácidos 22 a 250 de SEC ID n.º: 2.

55 [0131] En otro aspecto, el progenitor es un fragmento del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 que contiene al menos 200 residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos 210 residuos de aminoácidos o al menos 220 residuos de aminoácidos.

[0132] En otro aspecto, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

60 [0133] En otro aspecto, el progenitor se codifica por un polinucleótido con una identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o la secuencia de ADNc de la misma de al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que codifica un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 859 de SEC ID n.º: 1.

65 [0134] El progenitor puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-término

o el C-término de una región de otro polipéptido.

[0135] El progenitor puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión divisible donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido de la presente invención.

5 Un polipéptido de fusión se produce por la fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención.

Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen unir las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas están en marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo control del(los) mismo(s) promotor(es) y terminador.

10 Polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

[0136] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos.

15 En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando dos polipéptidos.

Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotecnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotecnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; and Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

20

[0137] El progenitor puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género.

25 Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el progenitor codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde el polinucleótido de la fuente ha sido insertado.

En un aspecto, el progenitor es secretado extracelularmente.

[0138] El progenitor puede ser un polipéptido bacteriano que tiene actividad de mejora celulolítica.

30 Por ejemplo, el progenitor puede ser un polipéptido bacteriano gram-positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *estafilococo*, *Streptococcus*, o polipéptido de *Streptomyces* que tiene actividad de mejora celulolítica, o un polipéptido bacteriano gram-negativo tal como un *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *helicobacteria*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, o *Ureaplasma* que tiene actividad de mejora celulolítica.

35 [0139] En un aspecto, el progenitor es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis* que tiene actividad de mejora celulolítica.

40 [0140] En otro aspecto, el progenitor es un polipéptidos de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus* que tiene actividad de mejora celulolítica.

45 [0141] En otro aspecto, el progenitor es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans* que tiene actividad de mejora celulolítica.

[0142] El progenitor puede ser un polipéptido fúngico que tiene actividad de mejora celulolítica.

50 Por ejemplo, el progenitor puede ser un polipéptido de levadura que tiene actividad de mejora celulolítica tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia* que tiene actividad de mejora celulolítica.

55 Por ejemplo, el progenitor puede ser un polipéptido fúngico filamentoso que tiene actividad de mejora celulolítica tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromices*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizofilum*, *scitalidio*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria* que tiene actividad de mejora celulolítica.

60 [0143] En otro aspecto, el progenitor es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis* que tiene actividad de mejora celulolítica.

65 [0144] En otro aspecto, el progenitor es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium*

5 *lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*,
Chrysosporium tropicum, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium*
crookwellense, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*,
10 *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium*
sarcochromum, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*,
Fusarium venenatum, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*,
Myceliophthora thermophila, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete*
chrysosporium, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia*
15 *fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*,
Thielavia subthermophila, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma*
longibrachiatum, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride* que tiene actividad de mejora celulolítica.

[0145] En otro aspecto, el progenitor es un polipéptido de *Aspergillus fumigatus* que tiene actividad de mejora
15 celulolítica, por ejemplo, el polipéptido que comprende el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

[0146] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e
imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de
especies por los que se conocen.

20 Expertos en la técnica fácilmente reconocerán la identidad de equivalentes apropiados.

[0147] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un número de colecciones de cultivo, tal
como la colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y colección de Patentes de Cultivos del Servicio de
Investigación para la Agricultura, centro de investigación Regional del Norte (NRRL).

[0148] El progenitor se puede identificar y obtener de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la
naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales
naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas arriba.

25 Técnicas para el aislamiento de microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales se conocen en la
técnica. Un polinucleótido que codifica un progenitor puede luego ser obtenido seleccionando de forma similar una
genoteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado.

30 Una vez que un polinucleótido que codifica un progenitor ha sido detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se
puede aislar o clonar por la utilización de técnicas que se conocen por los técnicos (ver, por ejemplo, Sambrook et
al., 1989, supra).

35 Preparación de variantes

[0149] Las variantes se pueden preparar utilizando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica,
tal como mutagénesis dirigida al sitio, construcción de genes sintéticos, construcción de genes semi-sintéticos,
40 mutagénesis aleatoria, redistribución, etc.

[0150] Mutagénesis dirigida al sitio es una técnica donde una o más (por ejemplo; varias) mutaciones se introducen
en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el progenitor.

45 [0151] Mutagénesis dirigida al sitio se puede realizar in vitro por PCR implicando el uso de cebadores
oligonucleótidos con la mutación deseada.

Mutagénesis dirigida al sitio puede también ser realizada in vitro por mutagénesis de "cassette" implicando la
escisión por una enzima de restricción a un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el
ligamiento progenitor y posterior de un oligonucleótido con la mutación en el polinucleótido.

50 Normalmente la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, permitiendo
extremidades pegajosas del plásmido y el inserto unirse entre sí.

Ver, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, Nucleic
Acids Res. 18: 7349-4966.

55 [0152] Mutagénesis dirigida al sitio puede también ser realizada in vivo por métodos conocidos en la técnica. Ver,
por ejemplo, publicación de solicitud de patente EEUU n° 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19:
773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16.

[0153] Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio se puede usar en la presente invención.

60 Hay muchos equipos comerciales disponibles que pueden utilizarse para preparar variantes.

[0154] La construcción de genes sintéticos implica la síntesis in vitro de una molécula de polinucleótido diseñada
para codificar un polipéptido de interés.

65 La síntesis de genes se puede realizar utilizando un número de técnicas, como la tecnología con base de microchip
multiplex descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares donde oligonucleótidos se
sintetizan y se unen en chips microfluídicos fotoprogramables.

[0155] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones, y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; Patente US No. 5,223,409; WO 92/06204 y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

[0156] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896).

Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y ordenar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0157] Construcción de genes semisintéticos se realiza por la combinación de aspectos de construcción de genes sintéticos, y/o mutagénesis dirigida al sitio, y/o mutagénesis aleatoria, y/o redistribución.

La construcción semisintética se caracteriza por un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que son sintetizados, en combinación con técnicas PCR.

Regiones definidas de genes pueden así ser sintetizadas *de novo*, mientras que otras regiones se pueden amplificar utilizando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras otras regiones se pueden someter a PCR con tendencia al error o amplificación de PCR sin tendencia al error.

Subsecuencias de polinucleótidos pueden luego ser redistribuidas.

Polinucleótidos

[0158] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una variante de la presente invención.

Constructos de ácidos nucleicos

[0159] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazada a una o varias secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0160] El polinucleótido se puede manipular en una variedad de vías para proveer a la expresión de una variante.

La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión.

Las técnicas para la modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0161] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión del polinucleótido.

El promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión de la variante.

El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestra actividad transcripcional en la célula huésped incluyendo promotores mutantes, truncados, e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0162] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, de gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), operón *lac* de *E. coli*, promotor *trc* de *E. coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25).

Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra.

Ejemplos de promotores en serie se describen en WO 99/43835.

[0163] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de

5 *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus awamori*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum Daria* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum Quinn* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y factor de alargamiento del movimiento de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados, e híbridos de los mismos.

15 Otros promotores son descritos en la patente de EEUU nº 6,011,147.

[0164] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, aDH2/GAP), triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros promotores útiles para células huéspedes de levadura están descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

25 [0165] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción, que se reconoce por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al término 3' del polinucleótido que codifica la variante. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

30 [0166] Terminadores preferidos para células huésped bacterianas son obtenidos de los genes para proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus clausii*, alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, y ARN ribosómico (*rrnB*) de *Escherichia coli*.

[0167] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y factor de elongación de la traducción de *Trichoderma reesei*.

[0168] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

45 Otros terminadores útiles para células huésped de levadura están descritos por Romanos et al., 1992, supra.

[0169] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm corriente abajo de un promotor y corriente arriba de la secuencia codificante de una variante de la presente invención que aumenta la expresión de la variante.

50 [0170] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas son obtenidas de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

55 [0171] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al término 5' del polinucleótido que codifica la variante. Cualquier líder que es funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

60 [0172] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0173] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

65

[0174] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al término de 3' de la secuencia de codificación de variante y, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito.

5 Cualquier secuencia de poliadenilación que es funcional en la célula huésped puede ser utilizada.

[0175] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glicosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

10 [0176] Secuencias de poliadenilación útiles para células huéspedes de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

[0177] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-término de una variante y dirige la variante en la vía secretora de la célula.

15 El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica la variante.

20 Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante.

Una secuencia codificante del péptido señal foráneo se puede requerir donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante del péptido señal.

Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foráneo puede sencillamente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante.

25 Sin embargo, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirige la variante expresada en la vía secretora de una célula huésped puede ser utilizada.

[0178] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus*, y *prsA* de *Bacillus subtilis*.

30 Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0179] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

35 [0180] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidas de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.

[0181] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-término de una variante.

45 El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos).

Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido.

La secuencia codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*.

50 [0182] Donde ambas secuencias del péptido señal y de propéptido están presentes, la secuencia del propéptido está situada junto al N-término de la variante y la secuencia del péptido señal está situada junto al N-término de la secuencia del propéptido.

55 [0183] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulan la expresión de la variante con respecto al crecimiento de la célula huésped.

Ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que causan que la expresión del gen sea activada o desactivada en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador.

60 Secuencias reguladoras en sistemas procarióticos incluyen los sistemas del operador *lac*, *tac*, y *trp*.

En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado.

En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, promotor de celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, y promotor de celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei* puede ser utilizado.

65 Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica.

En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica

en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante sería operativamente enlazado a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

5 [0184] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional.

10 Las distintas secuencias de nucleótidos y de control se pueden unir entre sí para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (por ejemplo; varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica la variante en tales sitios.

Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar por la inserción del polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión.

15 En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante es operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0185] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido.

20 La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en que el vector debe ser introducido.

El vector puede ser un plásmido lineal o cerrado circular.

25 [0186] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.

El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación.

Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el(los) cromosoma(s) en que ha sido integrado.

30 Además, un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede ser utilizado.

[0187] El vector contiene preferiblemente uno o más (por ejemplo; varios) marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de células transformadas, modificadas, transducidas, o similares.

35 Una etiqueta seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similar.

[0188] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o de *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomicina, o tetraciclina.

40 Marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3.

Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *adeA* (fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa), *adeB* (fosforribosil-aminoimidazol sintasa), *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos.

Son preferidos para usar en una célula de *Aspergillus* son *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* los genes *amdS* y *pyrG* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

50 Son preferidos para usar en una célula de *Trichoderma* los genes *adeA*, *adeB*, *amdS*, *hph*, y *pyrG*.

[0189] El marcador seleccionable puede ser un sistema de marcador seleccionable doble como se describe en WO 2010/039889.

55 En un aspecto, el marcador seleccionable doble es un sistema de marcador seleccionable doble *hph-tk*.

[0190] El vector contiene preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

60 [0191] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica de variante o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga.

Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el cromosoma(s).

65 Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10.000 pares de bases, 400 a 10.000 pares de bases, y 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un grado alto de identidad de secuencia a la secuencia objetivo

correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga.

Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped.

Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes.

5 Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0192] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión.

10 El origen de replicación puede ser cualquier replicador del plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula.

El término "origen de replicación" o "replicador del plásmido" significa un polinucleótido que permite a un plásmido o vector replicarse in vivo.

15 [0193] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMB1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

20 [0194] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0195] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883).

25 El aislamiento del gen AMA1 y construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0196] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de una variante.

30 Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido por la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y copias así adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

35 [0197] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

40 [0198] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazado a una o más (por ejemplo; varias) secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención.

45 Un constructo o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se duplica como se describe anteriormente.

El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

50 La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica de la variante y la fuente del progenitor.

[0199] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procarionota o una eucariota.

[0200] La célula huésped procarionota puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa.

55 Bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *estafilococo*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*.

Bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.

60 [0201] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluyendo, pero no limitada a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus thuringiensis*.

65 [0202] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluyendo, pero no limitada a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus*

equi subesp. *Zooepidemicus*.

[0203] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluyendo, pero no limitada a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y de *Streptomyces lividans*.

[0204] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (ver, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278).

La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (ver, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145).

La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar por transformación de protoplasto, electroporación (ver, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o transducción (ver, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294).

La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (ver, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397), o conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57).

La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar por competencia natural (ver, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (ver, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436).

Sin embargo, cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula huésped puede ser usada.

[0205] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta, o fúngica.

[0206] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye los filos de Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota al igual que Oomycota y todos hongos mitospóricos (como se define por Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK).

[0207] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascosporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes).

Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore, y Davenport, editors, Soc. App. Bacteriol. Serie de simposio nº 9, 1980).

[0208] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia* tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

[0209] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define por Hawksworth et al., 1995, supra).

Los hongos filamentosos son generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos.

El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico.

En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por el injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0210] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0211] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis*

pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, Chrysosporium zonatum, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides, Fusarium venenatum, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei, o Trichoderma viride.

[0212] Células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos, transformación de los protoplastos, y regeneración de la pared celular en cierto modo conocido per se.

Procedimientos adecuados para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* y *Trichoderma* están descritas en EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474, y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422.

Métodos adecuados para transformar las especies de *Fusarium* están descritas por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y WO 96/00787.

Levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; e Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0213] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una variante, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperación de la variante.

[0214] Las células huéspedes se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a escala pequeña o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, lote continuo, lote alimentado, o estado sólido) en los fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten a la variante ser expresada y/o aislada.

El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado comprendiendo fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo).

Si la variante se segrega en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no es segregada, se puede recuperar de lisatos de células.

[0215] La variante se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes.

Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no limitativa, uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático, o desaparición de un sustrato enzimático.

Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad de la variante.

[0216] La variante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitados a, colección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

En un aspecto, el caldo de fermentación entero es recuperado.

[0217] La variante se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoco, y de exclusión por tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

Composiciones

[0218] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una variante de la presente invención.

Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal variante.

El término "enriquecido" indica que la actividad de mejora celulolítica de la composición ha sido aumentada, por

ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

[0219] Las composiciones pueden comprender una variante de la presente invención como el componente enzimático mayor, por ejemplo, una composición monocomponente.

5 Alternativamente, las composiciones pueden comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una o más (varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, un polipéptido con actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasa, una esterasa, una expansina, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y un swolenina.

10 [0220] Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca.

Las composiciones se pueden estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

15 [0221] Las composiciones pueden ser una formulación de caldo de fermentación o una composición celular, como se describe en este caso.

Consecuentemente, la presente invención también se refiere a formulaciones de caldo de fermentación y composiciones celulares que comprenden una variante de la presente invención.

En algunas formas de realización, la composición es un caldo completo con inactivación celular que contiene ácido(s) orgánico(s), células muertas y/o detrito celular, y medio de cultivo.

20 [0222] El término "caldo de fermentación" como se utiliza en este caso se refiere a una preparación producida por fermentación celular que no sufre ninguna recuperación y/o purificación o una mínima.

Por ejemplo, caldos de fermentación se producen cuando cultivos microbianos crecen por saturación, se incuban bajo condiciones de limitación de carbono para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, expresión de enzimas por células huésped) y secreción en el medio de cultivo celular.

25 El caldo de fermentación puede contener contenido sin fraccionar o fraccionado de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación.

Típicamente, el caldo de fermentación no es fraccionado y comprende el medio de cultivo consumido y detrito celular presente después de que las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas) son quitadas, por ejemplo, por centrifugación.

30 En algunas formas de realización, el caldo de fermentación contiene medio de cultivo celular consumido, enzimas extracelulares, y células microbianas viables y/o no viables.

35 [0223] En una forma de realización, la formulación de caldo de fermentación y composiciones celulares comprenden un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal derivada y un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal derivada.

40 En una forma de realización específica, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal derivada, o una mezcla de dos o más de los anteriormente mencionados y el segundo componente de ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal derivada, o una mezcla de dos o más de los anteriormente mencionados.

[0224] En un aspecto, la composición contiene un(os) ácido(s) orgánico(s), y opcionalmente además contiene células muertas y/o detrito celular.

45 En una forma de realización, las células muertas y/o detrito celular son quitadas de un caldo completo con inactivación celular para proporcionar una composición que está libre de estos componentes.

50 [0225] Las formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares pueden comprender además un agente conservante y/o antimicrobiano (por ejemplo; bacterioestático) incluyendo, pero no limitado a, sorbitol, cloruro sódico, sorbato de potasio, y otros conocidos en la técnica.

60 [0226] Todo el caldo o composición con células muertas puede comprender además una o varias actividades enzimáticas tal como celobiohidrolasa, endoglucanasa, beta-glucosidasa, endo-beta-1,3(4)-glucanasa, glucohidrolasa, xiloglucanasa, xilanasa, xilosidasa, arabinofuranosidasa, alfa-glucuronidasa, acetil xilano esterasa, mananasa, manosidasa, alfa-galactosidasa, acetil manano esterasa, galactanasa, arabinanasa, pectato liasa, liasa de pectinasa, pectato liasa, poligalacturonasa, acetil pectina esterasa, pectina metilesterasa, beta-galactosidasa, galactanasa, arabinanasa, alfa-arabinofuranosidasa, ramnogalacturonasa, ramnogalacturonano liasa esterases de ácido ferrúlico, acetil ramnogalacturonano esterasa, xilogalacturonosidasa, xilogalacturonasa, ramnogalacturonano liasa, lignina peroxidases, peroxidases dependientes de manganeso, peroxidases híbridas, con propiedades combinadas de lignina peroxidases y peroxidases dependientes de manganeso, glucoamilasa, amilasa, proteasa, y lacasa.

65 [0227] En algunas formas de realización, todo el caldo o composición con células muertas incluye enzimas celulolíticas incluyendo, pero no limitado a, endoglucanasas (i) (EG) o 1,4-D-glucan-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4), (ii) exoglucanasas, incluyendo 1,4-D-glucan glucanohidrolasas (también conocidas como celodextrinas) (EC 3.2.1.74) y 1,4-D-glucan celobiohidrolasas (exo-celobiohidrolasas; CBH) (EC 3.2.1.91), y (iii) beta-glucosidasa

(BG) o beta-glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21).

[0228] Todo el caldo o composición con células muertas puede contener el contenido no fraccionado de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación.

5 Típicamente, todo el caldo o composición con inactivación celular contiene el medio de cultivo consumido y detrito celular presente después de que las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas) crezcan por saturación, se incuben bajo condiciones de limitación de carbono para permitir síntesis de proteína (por ejemplo, expresión de enzima(s) celulasa y/o glucosidasa).

10 En algunas formas de realización, todo el caldo o composición con células muertas contiene el medio de cultivo celular consumido, enzimas extracelulares, y células fúngicas filamentosas muertas.

En algunas formas de realización, las células microbianas presentes en todo el caldo o composición con células muertas se pueden permeabilizar y/o lisar usando métodos conocidos en la técnica.

15 [0229] Un caldo o composición celular entero como se describe en este caso es típicamente un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células muertas, detrito celular, componentes de medios de cultivo, y/o enzima(s) insoluble(s).

En algunas formas de realización, componentes insolubles se pueden quitar para proporcionar una composición líquida clarificada.

20 [0230] Las formulaciones de caldo entero y composiciones celulares de la presente invención se pueden producir por un método descrito en WO 90/15861 o WO 2010/096673.

[0231] Ejemplos son dados a continuación de usos preferidos de las composiciones de la presente invención.

25 La dosificación de la composición y otras condiciones bajo las cuales la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

30 [0232] La presente invención está también dirigida a los métodos siguientes para utilizar las variantes, o composiciones de las mismas.

[0233] La presente invención también se refiere a métodos para la degradación o conversión de un material celulósico, que comprende: tratar el material celulósico con una composición enzimática en presencia de una variante de la presente invención.

35 En un aspecto, los métodos además comprenden la recuperación del material celulósico degradado o convertido.

Productos solubles de degradación o conversión del material celulósico se pueden separar del material celulósico insoluble usando cualquier método bien conocido en la técnica tal como, por ejemplo, centrifugación, filtración, y/o asentamiento de gravedad.

40 [0234] La presente invención también se refiere a métodos para producir un producto de fermentación, que comprende: (a) sacarificación de un material celulósico con una composición enzimática en la presencia de una variante de la presente invención; (b) fermentación del material celulósico sacarificado con uno o más (por ejemplo; varios) microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

45 [0235] La presente invención también se refiere a métodos de fermentación de un material celulósico, que comprende: fermentación del material celulósico con uno o más (por ejemplo; varios) microorganismos fermentadores, donde el material celulósico se sacarifica con una composición enzimática en presencia de una variante de la presente invención.

50 En un aspecto, la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación.

En otro aspecto, los métodos además comprenden la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.

55 [0236] Los métodos de la presente invención pueden utilizarse para sacarificar el material celulósico en azúcares fermentables y para convertir los azúcares fermentables en muchos productos de fermentación útiles, por ejemplo, combustible, etanol potable, y/o productos químicos de plataforma (por ejemplo, ácidos, alcoholes, cetonas, gases, y similares).

La producción de un producto de fermentación deseado del material celulósico implica típicamente pretratamiento, hidrólisis enzimática (sacarificación), y fermentación.

60 [0237] El procesamiento del material celulósico según la presente invención se puede realizar usando procesos convencionales en la técnica. Además, los métodos de la presente invención se pueden implementar utilizando cualquier equipo de procesamiento de biomasa convencional configurado para operar conforme a la invención.

65 [0238] Hidrólisis (sacarificación) y fermentación, separada o simultánea, incluyen, pero de forma no limitativa, hidrólisis y fermentación separada (SHF); sacarificación y fermentación simultánea (SSF); sacarificación simultánea y co-fermentación (SSCF); hidrólisis híbrida y fermentación (HHF); hidrólisis separada y co-fermentación (SHCF);

hidrólisis híbrida y co-fermentación (HHCF); y conversión microbiana directa (DMC), también a veces llamado bioprocesamiento consolidado (CBP).

SHF usa pasos del proceso separados para primero hidrolizar enzimáticamente el material celulósico en azúcares fermentables, por ejemplo, glucosa, celobiosa, y monómeros de pentosa, y luego fermentar los azúcares fermentables a etanol.

En SSF, la hidrólisis enzimática del material celulósico y la fermentación de azúcares a etanol se combinan en un paso (Philippidis, G. P., 1996, *Cellulose bioconversion technology*, in *Handbook on Bioethanol: Production and Utilization*, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

SSCF implica la co-fermentación de azúcares múltiples (Sheehan, J., e Himmel, M., 1999, *Enzymes, energy and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol*, *Biotechnol. Prog.* 15: 817-827).

HHF implica un paso de hidrólisis separada, y además un paso simultáneo de sacarificación y de hidrólisis, que pueden efectuarse en el mismo reactor.

Los pasos en un proceso HHF pueden llevarse a cabo a temperaturas diferentes, es decir, sacarificación enzimática de alta temperatura seguida de SSF a una temperatura inferior que la que puede tolerar la cepa de fermentación.

DMC combina los tres procesos (producción enzimática, hidrólisis, y fermentación) en uno o más (por ejemplo; varios) pasos donde el mismo organismo se usa para producir las enzimas para conversión del material celulósico en azúcares fermentables y para convertir los azúcares fermentables en un producto final (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., y Pretorius, I. S., 2002, *Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology*, *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* 66: 506-577).

Se entiende aquí que cualquier método conocido en la técnica que comprende pretratamiento, hidrólisis enzimática (sacarificación), fermentación, o una combinación de los mismos, se puede usar en la práctica de los métodos de la presente invención.

[0239] Un equipo convencional puede incluir un reactor agitado de lote alimentado, un reactor agitado de lote, un reactor agitado de flujo continuo con ultrafiltración, y/o un reactor de columna de flujo de pistón continuo (Fernanda de Castilhos Corazza, Flávio Faria de Moraes, Gisella Maria Zanin e Ivo Neitzel, 2003, *Optimal control in fed-batch reactor for the cellobiose hydrolysis*, *Acta Scientiarum. Technology* 25: 33-38; Gusakov, A. V., y Sinityn, A. P., 1985, *Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process*, *Enz. Microb. Technol.* 7: 346-352), un reactor de desgaste (Ryu, S. K., y Lee, J. M., 1983, *Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor*, *Biotechnol. Bioeng.* 25: 53-65), o un reactor con agitación intensiva inducida por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinityn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, *Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 141-153).

Tipos de reactor adicionales incluyen: reactores de lecho fluidificado, de manto de flujo ascendente, inmovilizado, y de tipo extrusor para hidrólisis y/o fermentación.

[0240] Pretratamiento.

Al poner en práctica los métodos de la presente invención, cualquier proceso de pretratamiento conocido en la técnica puede utilizarse para interrumpir componentes de pared celular vegetal del material celulósico (Chandra et al., 2007, *Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics?* *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 108: 67-93; Galbe and Zacchi, 2007, *Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production*, *Adv. Biochem. Engin. / Biotechnol.* 108: 41-65; Hendriks y Zeeman, 2009, *Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass*, *Bioresource Technol.* 100: 10-18; Mosier et al., 2005, *Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass*, *Bioresource Technol.* 96: 673-686; Taherzadeh y Karimi, 2008, *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review*, *Int. J. of Mol. Sci.* 9: 1621-1651; Yang y Wyman, 2008, *Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol*, *Biofuels Bioproducts and Biorefining-Biofpr.* 2: 26-40).

[0241] El material celulósico puede también ser sometido a reducción de tamaño de partícula, tamizado, prerremojado, humidificación, lavado, y/o acondicionamiento antes del pretratamiento usando métodos conocidos en la técnica.

[0242] Pretratamientos convencionales incluyen, pero de forma no limitativa, pretratamiento con vapor (con o sin explosión), pretratamiento de ácido diluido, pretratamiento de agua caliente, pretratamiento alcalino, pretratamiento de cal, oxidación en húmedo, explosión en húmedo, explosión de fibra de amoníaco, pretratamiento organosolv, y pretratamiento biológico.

Pretratamientos adicionales incluyen pretratamientos de filtración de amoníaco, de ultrasonidos, de electroporación, de microondas, de CO₂ supercrítico, de H₂O supercrítico, de ozono, de líquido iónico, y de irradiación gamma.

[0243] El material celulósico se puede pretratar antes de hidrólisis y/o fermentación.

El pretratamiento es preferiblemente realizado antes de la hidrólisis.

Alternativamente, el pretratamiento puede llevarse a cabo simultáneamente con hidrólisis enzimática para liberar azúcares fermentables, tal como glucosa, xilosa, y/o celobiosa.

En la mayoría de los casos el paso de pretratamiento mismo produce alguna conversión de la biomasa en azúcares fermentables (incluso en ausencia de enzimas).

[0244] Pretratamiento con vapor.

En el pretratamiento con vapor, el material celulósico se calienta para interrumpir los componentes de la pared celular vegetal, incluyendo lignina, hemicelulosa, y celulosa para hacer la celulosa y otras fracciones, por ejemplo, hemicelulosa, accesible para enzimas.

5 El material celulósico se pasa a o a través de un recipiente de reacción donde se inyecta vapor para aumentar la temperatura a la temperatura requerida y presión y se retiene ahí durante el tiempo de reacción deseado.

El pretratamiento con vapor es preferiblemente realizado a 140-250°C, por ejemplo, 160-200°C o 170-190°C, donde la gama de temperatura óptima depende de la adición de un catalizador químico.

10 El periodo de permanencia para el pretratamiento con vapor es preferiblemente 1-60 minutos, por ejemplo, 1-30 minutos, 1-20 minutos, 3-12 minutos, o 4-10 minutos, donde el periodo de permanencia óptimo depende de la gama de temperatura y adición de un catalizador químico.

El pretratamiento con vapor permite cargas de sólidos relativamente altas, de modo que el material celulósico es generalmente húmedo solo durante el pretratamiento.

15 El pretratamiento con vapor es frecuentemente combinado con una descarga explosiva del material después del pretratamiento, lo que se conoce como explosión de vapor, es decir, expansión rápida hasta la presión atmosférica y flujo turbulento del material para aumentar el área de superficie accesible por fragmentación (Duff y Murray, 1996, Bioresource Technology 85: 1-33; Galbe y Zacchi, 2002, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 618-628; solicitud de patente estadounidense nº 20020164730).

20 Durante el pretratamiento con vapor, los grupos de acetil hemicelulosa se dividen y el ácido resultante autocataliza la hidrólisis parcial de la hemicelulosa a monosacáridos y oligosacáridos.

La lignina es quitada solo hasta una extensión limitada.

[0245] Pretratamiento químico: el término "tratamiento químico" se refiere a cualquier pretratamiento químico que promueve la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

25 Tal pretratamiento puede convertir celulosa cristalina en celulosa amorfa.

Ejemplos de procesos de pretratamiento químico adecuado incluyen, por ejemplo, pretratamiento de ácido diluido, pretratamiento de cal, oxidación en húmedo, explosión por congelación de la fibra de amoníaco (AFEX), filtración de amoníaco (APR), líquido iónico, y pretratamientos de organosolv.

30 [0246] Un catalizador tal como H₂SO₄ o SO₂ (típicamente 0,3 a 5% p/p) es frecuentemente adicionado antes del pretratamiento de vapor, que reduce el tiempo y temperatura, aumenta la recuperación, y mejora la hidrólisis enzimática (Ballesteros et al., 2006, Appl. Biochem. Biotechnol. 129-132: 496-508; Varga et al., 2004, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116: 509-523; Sassner et al., 2006, Enzym Microb. Technol. 39: 756-762).

35 En el pretratamiento de ácido diluido, el material celulósico se mezcla con ácido diluido, típicamente H₂SO₄, y agua para formar un lodo, calentado por vapor a la temperatura deseada, y después de un periodo de permanencia expandido hasta la presión atmosférica.

40 El pretratamiento de ácido diluido se puede realizar con un número de diseños de reactor, por ejemplo, reactores de flujo de pistón, reactores de contracorriente, o reactores de lecho de encogimiento de contracorriente continua (Duff y Murray, 1996, supra; Schell et al., 2004, Bioresource Technol. 91: 179-188; Lee et al., 1999, Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 65: 93-115).

[0247] Diferentes métodos de pretratamiento bajo condiciones alcalinas también pueden usarse.

Estos pretratamientos alcalinos incluyen, pero de forma no limitativa, hidróxido sódico, cal, oxidación en húmedo, filtración de amoníaco (APR), y explosión por congelación de la fibra de amoníaco (AFEX).

45 [0248] Pretratamiento de cal se realiza con óxido de calcio o hidróxido cálcico a temperaturas de 85-150°C y tiempos de estancia desde 1 hora a varios días (Wyman et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 1959-1966; Mosier et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 673-686).

50 WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900, y WO 2006/110901 revelan métodos de pretratamiento usando amoníaco.

[0249] Oxidación en húmedo es un pretratamiento térmico realizado típicamente a 180-200°C durante 5-15 minutos con adición de un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno o sobrepresión de oxígeno (Schmidt y Thomsen, 1998, Bioresource Technol. 64: 139-151; Palonen et al., 2004, Appl. Biochem. Biotechnol. 117: 1-17; Varga et al., 2004, Biotechnol. Bioeng. 88: 567-574; Martin et al., 2006, J. Chem. Technol. Biotechnol. 81: 1669-1677).

55 El pretratamiento se realiza preferiblemente a 1-40% sustancia seca, por ejemplo, 2-30% sustancia seca o 5-20% sustancia seca, y frecuentemente el pH inicial se aumenta por la adición de álcali tal como carbonato de sodio.

[0250] Una modificación del método de pretratamiento de oxidación en húmedo, conocido como explosión en húmedo (combinación de oxidación en húmedo y explosión de vapor) puede manipular la sustancia seca hasta 30%. En la explosión en húmedo, el agente oxidante se introduce durante pretratamiento después de un determinado tiempo de estancia.

El pretratamiento es luego terminado por la expansión hasta la presión atmosférica (WO 2006/032282).

65 [0251] Explosión de fibra de amoníaco (AFEX) implica tratamiento del material celulósico con líquido o amoníaco gaseoso a temperaturas moderadas tal como 90-150°C y alta presión tal como 17-20 bar durante 5-10 minutos,

donde el contenido de sustancia en seco puede ser tan alto como 60% (Gollapalli et al., 2002, Appl. Biochem. Biotechnol. 98: 23-35; Chundawat et al., 2007, Biotechnol. Bioeng. 96: 219-231; Alizadeh et al., 2005, Appl. Biochem. Biotechnol. 121: 1133-1141; Teymouri et al., 2005, Bioresource Technol. 96: 2014-2018).

Durante el pretratamiento de AFEX la celulosa y hemicelulosas permanecen relativamente intactas.

5 Complejos de lignina-carbohidrato son divididos.

[0252] Pretratamiento de organosolv delignifica el material celulósico por extracción usando etanol acuoso (40-60% etanol) a 160-200°C durante 30-60 minutos (Pan et al., 2005, Biotechnol. Bioeng. 90: 473-481; Pan et al., 2006, Biotechnol. Bioeng. 94: 851-861; Kurabi et al., 2005, Appl. Biochem. Biotechnol. 121: 219-230).

10 Ácido sulfúrico es normalmente adicionado como un catalizador.

En el pretratamiento de organosolv, la mayoría de hemicelulosa y lignina es quitada.

[0253] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados están descritos por Schell et al., 2003, Appl. Biochem. and Biotechnol. Vol. 105-108, pág. 69-85, y Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686, y solicitud estadounidense publicada 2002/0164730.

15 [0254] En un aspecto, el pretratamiento químico es preferiblemente realizado como un tratamiento de ácido diluido, y más preferiblemente como un tratamiento de ácido diluido continuo.

El ácido es típicamente ácido sulfúrico, pero otros ácidos también pueden usarse, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido succínico, cloruro de hidrógeno, o mezclas derivadas.

20 Tratamiento de ácido moderado se conduce en el margen de pH de preferiblemente 1-5, por ejemplo, 1-4 o 1-2.5.

En un aspecto, la concentración de ácido está en el rango de preferiblemente 0,01 a 10 % en peso de ácido, por ejemplo, 0,05 a 5 % en peso de ácido o 0,1 a 2 % en peso de ácido.

25 El ácido se contacta con el material celulósico y se mantiene a una temperatura en el rango de preferiblemente 140-200°C, por ejemplo, 165-190°C, durante periodos que varían de 1 a 60 minutos.

[0255] En otro aspecto, el pretratamiento tiene lugar en un lodo acuoso.

En aspectos preferidos, el material celulósico está presente durante el pretratamiento en cantidades preferiblemente entre 10-80 % en peso, por ejemplo, 20- 70 % en peso o 30-60 % en peso, tal como alrededor de 40 % en peso.

30 El material celulósico pretratado puede ser no lavado o lavado utilizando cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, lavado con agua.

[0256] Pretratamiento mecánico o pretratamiento físico: el término "pretratamiento mecánico" o "pretratamiento físico" se refiere a cualquier pretratamiento que promueve la reducción del tamaño de partículas.

35 Por ejemplo, tal pretratamiento puede implicar varios tipos de trituración o fresado (por ejemplo, molienda en seco, molienda en húmedo, o fresado de bola vibratoria).

[0257] El material celulósico se puede pretratar tanto físicamente (mecánicamente) como químicamente.

40 El pretratamiento mecánico o físico se puede acoplar con explosión de vaporización, hidrotermólisis, tratamiento de ácido diluido o moderado, alta temperatura, tratamiento de alta presión, irradiación (por ejemplo, irradiación de microondas), o combinaciones de los mismos.

En un aspecto, alta presión se refiere a presión en el rango de preferiblemente aproximadamente 100 a aproximadamente 400 psi, por ejemplo, aproximadamente 150 a aproximadamente 250 psi.

45 En otro aspecto, alta temperatura significa temperaturas en el rango de aproximadamente 100 a aproximadamente 300°C, por ejemplo, aproximadamente 140 a aproximadamente 200°C.

En un aspecto preferido, pretratamiento mecánico o físico se realiza en un procesamiento por lotes que utiliza un sistema de hidrolizador de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo, un Sunds Hydrolyzer disponible por Sunds Defibrator AB, Suecia.

50 Los pretratamientos físicos y químicos pueden llevarse a cabo consecutivamente o simultáneamente, como se desee.

[0258] Por consiguiente, en un aspecto preferido, el material celulósico está sujeto a pretratamiento físico (mecánico) o químico, o cualquier combinación de los mismos, para promover la separación y/o liberar celulosa, hemicelulosa, y/o lignina.

55 [0259] Pretratamiento biológico: el término "pretratamiento biológico" se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueve la separación y/o libera celulosa, hemicelulosa, y/o lignina del material celulósico.

Técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar aplicar microorganismos y/o enzimas solubilizantes de lignina (ver, por ejemplo, Hsu, T.-A., 1996, Pretreatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization,

60 Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh and Singh, 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of cellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, J. D., 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels

Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., y Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, capítulo 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from

65 renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996, Fermentation of lignocellulosic

hydrolysates for ethanol production, *Enz. Microb. Tech.* 18: 312-331; y Vallander y Eriksson, 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 42: 63-95).

[0260] Sacarificación.

5 En la etapa de hidrólisis, también conocida como sacarificación, el material celulósico, por ejemplo, pretratado, se hidroliza para descomponer celulosa y/o hemicelulosa a azúcares fermentables, tal como glucosa, celobiosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, manosa, galactosa, y/o oligosacáridos solubles.

La hidrólisis se realiza enzimáticamente por una composición enzimática en presencia de una variante de la presente invención.

10 Los componentes de las composiciones se pueden adicionar simultáneamente o consecutivamente.

[0261] Hidrólisis enzimática es preferiblemente realizada en un ambiente acuoso adecuado bajo condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. En un aspecto, la hidrólisis es realizada bajo condiciones adecuadas para la actividad de los componentes enzimáticos, es decir, óptimas para los componentes enzimáticos.

15 La hidrólisis puede llevarse a cabo como un flujo continuo o proceso continuo donde el material celulósico es alimentado gradualmente a, por ejemplo, una solución de hidrólisis que contiene enzima.

[0262] La sacarificación es generalmente realizada en los reactores de tanque agitado o fermentadores bajo pH, temperatura, y condiciones de mezcla controlados.

20 Tiempo de proceso, temperatura y condiciones de pH adecuados pueden rápidamente ser determinados por un experto en la técnica. Por ejemplo, la sacarificación puede durar hasta 200 horas, pero es típicamente realizada durante preferiblemente aproximadamente 12 a aproximadamente 120 horas, por ejemplo, aproximadamente 16 a aproximadamente 72 horas o aproximadamente 24 a aproximadamente 48 horas.

25 La temperatura está en el rango de preferiblemente aproximadamente 25°C a aproximadamente 70°C, por ejemplo, aproximadamente 30°C a aproximadamente 65°C, aproximadamente 40°C a aproximadamente 60°C, o aproximadamente 50°C a aproximadamente 55°C.

30 El pH está en el rango de preferiblemente aproximadamente 3 a aproximadamente 8, por ejemplo, aproximadamente 3.5 a aproximadamente 7, aproximadamente 4 a aproximadamente 6, o aproximadamente 5.0 a aproximadamente 5.5.

El contenido en sustancias secas está en el rango de preferiblemente aproximadamente 5 a aproximadamente 50 % en peso, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 40 % en peso o aproximadamente 20 a aproximadamente 30 % en peso.

35 [0263] Las composiciones enzimáticas pueden comprender cualquier proteína útil en la degradación del material celulósico.

[0264] En un aspecto, la composición enzimática comprende o comprende además una o más (por ejemplo; varias) proteínas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, un polipéptido con actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasa, una esterasa, una expansina, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swolenina.

40 En otro aspecto, la celulasa es preferiblemente una o más (por ejemplo; varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

45 En otro aspecto, la hemicelulasa es preferiblemente una o más (por ejemplo; varias) enzimas seleccionadas del grupo consistente en una esterasa de acetilmanano, una acetilxilano esterasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una glucuronoil esterasa, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa.

[0265] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (por ejemplo; varias) enzimas celulolíticas.

50 En otro aspecto, la composición enzimática comprende o comprende además una o más (por ejemplo; varias) enzimas hemicelulolíticas.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (por ejemplo; varias) enzimas celulolíticas y una o más (por ejemplo, varias) enzimas hemicelulolíticas.

55 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una o más (por ejemplo; varias) enzimas seleccionadas del grupo de enzimas celulolíticas y enzimas hemicelulolíticas.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una beta-glucosidasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

60 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

65 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una beta-glucosidasa y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa y una celobiohidrolasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa y una beta-glucosidasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa y una beta-glucosidasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

5 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

10 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, y una beta-glucosidasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una endoglucanasa, una celobiohidrolasa, una beta-glucosidasa, y un polipéptido con actividad de mejora celulolítica.

[0266] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una acetilmanano esterasa.

15 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una acetilxilano esterasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una arabinanasa (por ejemplo, alfa-L-arabinanasa).

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una arabinofuranosidasa (por ejemplo, alfa-L-arabinofuranosidasa).

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa de ácido cumárico.

20 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una feruloil esterasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una galactosidasa (por ejemplo, alfa-galactosidasa y/o beta-galactosidasa).

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una glucuronidasa (por ejemplo, alfa-D-glucuronidasa).

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una glucuronoil esterasa.

25 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una mananasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una manosidasa (por ejemplo, beta manosidasa).

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una xilanasa.

En un aspecto preferido, la xilanasa es una xilanasa de Familia 10.

30 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una xilosidasa (por ejemplo, beta-xilosidasa).

[0267] En otro aspecto, la composición enzimática comprende una esterasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una expansina.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una lacasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una enzima ligninolítica.

35 En un aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una manganeso peroxidasa.

En otro aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una lignina peroxidasa.

En otro aspecto preferido, la enzima ligninolítica es una enzima productora de H₂O₂.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una pectinasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una peroxidasa.

40 En otro aspecto, la composición enzimática comprende una proteasa.

En otro aspecto, la composición enzimática comprende una swolenina.

[0268] En los métodos de la presente invención, la(s) enzima(s) se puede(n) adicionar antes de o durante sacarificación, sacarificación y fermentación, o fermentación.

45 [0269] Uno o más (por ejemplo; varios) componentes de la composición enzimática pueden ser proteínas tipo salvaje, proteínas recombinantes, o una combinación de proteínas de tipo salvaje y proteínas recombinantes.

Por ejemplo, uno o más (por ejemplo; varios) componentes pueden ser proteínas nativas de una célula, que se usan como una célula huésped para expresar recombinantemente uno o más (por ejemplo; varios) otros componentes de la composición enzimática.

50 Uno o más (por ejemplo; varios) componentes de la composición enzimática se pueden producir como monocomponentes, que son luego combinados para formar la composición enzimática.

La composición enzimática puede ser una combinación de preparaciones de proteínas multicomponentes y monocomponentes.

55 [0270] Las enzimas usadas en los métodos de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el uso, tal como, por ejemplo, una formulación de caldo de fermentación o una composición celular, un lisado celular con o sin detrito celular, una preparación semi-purificada o purificada enzimática, o una célula huésped como una fuente de las enzimas.

60 La composición enzimática puede ser un polvo seco o granulado, un granulado no en polvo, un líquido, un líquido estabilizado, o una enzima protegida estabilizada.

Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tales como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico según procesos establecidos.

65 [0271] Las cantidades óptimas de las enzimas y una variante de la presente invención dependen de diferentes factores incluyendo, pero no limitados a, la mezcla de componentes enzimáticos celulolíticos y/o hemicelulolíticos, el

sustrato celulósico, la concentración de sustrato celulósico, el(los) pretratamiento(s) del sustrato celulósico, temperatura, tiempo, pH, e inclusión de organismo fermentador (por ejemplo, levadura para sacarificación simultánea y fermentación).

5 [0272] En un aspecto, una cantidad eficaz de proteína enzimática celulolítica o hemicelulolítica para material
celulósico es de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 50 mg, preferiblemente de aproximadamente 0.5 a
aproximadamente 40 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 25 mg, más
preferiblemente de aproximadamente 0.75 a aproximadamente 20 mg, más preferiblemente de aproximadamente
10 0.75 a aproximadamente 15 mg, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 10 mg, y de
la forma más preferible de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 10 mg por g de material celulósico.

[0273] En otro aspecto, una cantidad eficaz de una variante con actividad de mejora celulolítica para material
celulósico es aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50.0 mg, preferiblemente de aproximadamente 0.01 a
aproximadamente 40 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 30 mg, más
15 preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg, más preferiblemente de aproximadamente
0.01 a aproximadamente 10 mg, más preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 mg, más
preferiblemente de aproximadamente de 0.025 a aproximadamente 1.5 mg, más preferiblemente de
aproximadamente de 0.05 a aproximadamente 1.25 mg, más preferiblemente de aproximadamente de 0.075 a
aproximadamente 1.25 mg, más preferiblemente de aproximadamente de 0.1 a aproximadamente 1.25 mg, aún más
20 preferiblemente de aproximadamente de 0.15 a aproximadamente 1.25 mg, y de la forma más preferible de
aproximadamente de 0.25 a aproximadamente 1.0 mg por g de material celulósico.

[0274] En otro aspecto, una cantidad eficaz de una variante con actividad de mejora celulolítica para proteína
enzimática celulolítica es aproximadamente 0.005 a aproximadamente 1.0 g, preferiblemente de aproximadamente
25 0.01 a aproximadamente 1.0 g, más preferiblemente de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 0.75 g, más
preferiblemente de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 0.5 g, más preferiblemente de aproximadamente 0.1
a aproximadamente 0.5 g, aún más preferiblemente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 0.5 g, y de la
forma más preferible de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.2 g por g de proteína enzimática celulolítica.

30 [0275] Los polipéptidos con actividad enzimática celulolítica o actividad enzimática hemicelulolítica al igual que otras
proteínas/polipéptidos útiles en la degradación del material celulósico, por ejemplo, polipéptidos GH61 que tienen
actividad de mejora celulolítica (colectivamente de ahora en adelante "polipéptidos que tienen actividad enzimática")
se pueden derivar u obtener de cualquier origen adecuado, incluyendo bacteriano fúngico, levadura, planta, u origen
mamífero.

35 El término "obtenido" también significa aquí que la enzima se puede producir recombinantemente en un organismo
huésped empleando métodos descritos aquí, donde la enzima producida recombinantemente es bien nativa o
foránea al organismo huésped o tiene una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, teniendo uno o más
(por ejemplo; varios) aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida
recombinantemente que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima
40 producida por procesos de redistribución de ácidos nucleicos conocidos en la técnica. Comprendidas en el
significado de una enzima nativa están las variantes naturales y en el significado de una enzima foránea están las
variantes obtenidas recombinantemente, tal como por mutagénesis dirigida al sitio o redistribución.

[0276] Un polipéptido con actividad enzimática puede ser un polipéptido bacteriano.
45 Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*,
Streptococcus, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus*,
Caldicellulosiruptor, *Acidothermus*, *Thermobifidia*, u *Oceanobacillus* teniendo actividad enzimática, o un polipéptido
bacteriano Gram negativo tal como un polipéptido de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*,
50 *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, o *Ureaplasma* teniendo actividad enzimática.

[0277] En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus*
brevis, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus*
licheniformis, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus*
thuringiensis teniendo actividad enzimática.
55

[0278] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*,
Streptococcus uberis, o *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus* teniendo actividad enzimática.

[0279] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*,
60 *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans* teniendo actividad enzimática.

[0280] El polipéptido con actividad enzimática también puede ser un polipéptido fúngico, y más preferiblemente un
polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*,
Schizosaccharomyces, o *Yarrowia* teniendo actividad enzimática; o más preferiblemente un polipéptido fúngico
filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*,
65 *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*,

Cryphonectria, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella*, o *Xylaria* teniendo actividad enzimática.

[0281] En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis* teniendo actividad enzimática.

[0282] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *microspora de Thielavia*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, o *Trichophaea saccata* teniendo actividad enzimática.

[0283] Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas de polipéptidos teniendo actividad enzimática también pueden ser usados.

[0284] Uno o más (por ejemplo; varios) componentes de la composición enzimática pueden ser un componente recombinante, es decir, producido por clonación de una secuencia de ADN que codifica el componente único y célula posterior transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (ver, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244).

El huésped es preferiblemente un huésped heterólogo (enzima es foránea al huésped), pero el huésped puede bajo ciertas condiciones también ser un huésped homólogo (enzima es nativa para el huésped).

Proteínas celulolíticas monocomponentes también se pueden preparar por la purificación de tal proteína de un caldo de fermentación.

[0285] En un aspecto, una o más (por ejemplo; varias) enzimas celulolíticas comprenden una preparación enzimática celulolítica comercial.

Ejemplos de preparaciones enzimáticas celulolíticas comerciales adecuadas para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLIC® CTec (Novozymes A/S), CELLIC® CTec2 (Novozymes A/S), CELLUCLAST™ (Novozymes A/S), NOVOZYME™ 188 (Novozymes A/S), CELLUZYME™ (Novozymes A/S), CEREFLO™ (Novozymes A/S), y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), ACCELERASE™ (Genencor Int.), LAMINEX™ (Genencor Int.), SPEZYME™ CP (Genencor Int.), FILTRASE® NL (DSM); METHAPLUS® S/L 100 (DSM), ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH), FIBREZYME® LDI (Dyadic International, Inc.), FIBREZYME® LBR (Dyadic International, Inc.) o VISCOSTAR® 150L (Dyadic International, Inc.).

Las enzimas de celulasa se agregan en cantidades efectivas de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5.0 % en peso de sólidos, por ejemplo, aproximadamente 0.025 a aproximadamente 4.0 % en peso de sólidos o aproximadamente 0.005 a aproximadamente 2.0 % en peso de sólidos.

[0286] Ejemplos de endoglucanasas bacterianas que se pueden usar en los métodos de la presente invención, incluyen, pero de forma no limitativa, una endoglucanasa de *Acidothermus cellulolyticus* (WO 91/05039; WO 93/15186; patente estadounidense n° 5.275.944; WO 96/02551; patente estadounidense n° 5.536.655, WO 00/70031, WO 05/093050); endoglucanasa III de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050); y endoglucanasa V de *Thermobifida fusca* (WO 05/093050).

[0287] Ejemplos de endoglucanasas fúngicas que se pueden usar en la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, una endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* (Penttila et al., 1986, Gene 45: 253-263; endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* Cel7B; número de accesoión de GENBANK™ M15665 SEC ID n.º: 4); endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* (Saloheimo, et al., 1988, Gene 63:11-22; endoglucanasa II Cel5A de *Trichoderma reesei*; número de accesoión de GENBANK™ M19373 SEC ID n.º: 6) endoglucanasa III de *Trichoderma reesei* (Okada et al., 1988, Appl. Environ. Microbiol. 64: 555-563; número de accesoión de GENBANK™ AB003694 SEC ID n.º: 8) endoglucanasa V de *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 1994, Molecular Microbiology 13: 219-228; número de accesoión de GENBANK™ Z33381; SEC ID n.º: 10) endoglucanasa de *Aspergillus aculeatus* (Ooi et al., 1990, Nucleic Acids Research 18: 5884) endoglucanasa de *Aspergillus kawachii* (Sakamoto et al., 1995, Current Genetics 27: 435-439) endoglucanasa de *Erwinia carotovora* (Saarilahti et al., 1990, Gene 90: 9-14) endoglucanasa de

Fusarium oxysporum (número de accesoión de GENBANK™ L29381); endoglucanasa de *Humicola grisea* var. *thermoidea* (número de accesoión de GENBANK™ AB003107) endoglucanasa de *Melanocarpus albomyces* (número de accesoión de GENBANK™ MAL515703) endoglucanasa de *Neurospora crassa* (número de accesoión de GENBANK™ XM 324477) endoglucanasa V de *Humicola insolens* (SEC ID nº 12); endoglucanasa de *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65 (SEC ID nº: 14); endoglucanasa de basidiomiceto CBS 495.95 (SEC ID nº: 16); endoglucanasa de basidiomiceto CBS 494.95 (SEC ID nº: 18); endoglucanasa CEL6B de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (SEC ID nº: 20); endoglucanasa CEL6C de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (SEC ID nº: 22); endoglucanasa CEL7C de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (SEC ID nº: 24); endoglucanasa CEL7E de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (SEC ID nº: 26); endoglucanasa CEL7F de *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (SEC ID nº: 28); endoglucanasa CEL7A de *Cladorrhinum foecundissimum* ATCC 62373 (SEC ID nº 30); y endoglucanasa de la cepa de *Trichoderma reesei* nº. VTT-D-80133 (SEC ID nº: 32; número de accesoión de GENBANK™ M15665).

Las endoglucanasas de SEC ID nº: 4, SEC ID nº: 6, SEC ID nº: 8, SEC ID nº: 10, SEC ID nº: 12, SEC ID nº: 14, SEC ID nº: 16, SEC ID nº: 18, SEC ID nº: 20, SEC ID nº: 22, SEC ID nº: 24, SEC ID nº: 26, SEC ID nº: 28, SEC ID nº: 30, y SEC ID nº: 32, anteriormente descritas se codifican por la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3, SEC ID nº: 5, SEC ID nº: 7, SEC ID nº: 9, SEC ID nº: 11, SEC ID nº: 13, SEC ID nº: 15, SEC ID nº: 17, SEC ID nº: 19, SEC ID nº: 21, SEC ID nº: 23, SEC ID nº: 25, SEC ID nº: 27, SEC ID nº: 29, y SEC ID nº: 31, respectivamente.

[0288] Ejemplos de celobiohidrolasas útiles en la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* (SEC ID nº: 34); celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei* (SEC ID nº: 36); celobiohidrolasa I de *Humicola insolens* (SEC ID nº: 38); celobiohidrolasa II de *Myceliophthora thermophila* (SEC ID nº: 40 y SEC ID nº: 42); celobiohidrolasa II (CEL6A) de *Thielavia terrestris* (SEC ID nº: 44); celobiohidrolasa I de *Chaetomium thermophilum* (SEC ID nº: 46); y celobiohidrolasa II de *Chaetomium thermophilum* (SEC ID nº: 48), celobiohidrolasa I de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID nº: 50), y celobiohidrolasa II de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID nº: 52).

Las celobiohidrolasas de SEC ID nº: 34, SEC ID nº: 36, SEC ID nº: 38, SEC ID nº: 40, SEC ID nº: 42, SEC ID nº: 44, SEC ID nº: 46, SEC ID nº: 48, SEC ID nº: 50, y SEC ID nº: 52, anteriormente descritas se codifican por la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 33, SEC ID nº: 35, SEC ID nº: 37, SEC ID nº: 39, SEC ID nº: 41, SEC ID nº: 43, SEC ID nº: 45, SEC ID nº: 47, SEC ID nº: 49, y SEC ID nº: 51, respectivamente.

[0289] Ejemplos de beta-glucosidasas útiles en la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (SEC ID nº: 54); beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID nº: 56); beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* IBT 20888 (SEC ID nº: 58); beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* (SEC ID nº: 60); y beta-glucosidasa de *Aspergillus aculeatus* (SEC ID nº: 62).

Las beta-glucosidasas de SEC ID nº: 54, SEC ID nº: 56, SEC ID nº: 58, SEC ID nº: 60, y SEC ID nº: 61 descritas arriba se codifican por la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID nº: 53, SEC ID nº: 55, SEC ID nº: 57, SEC ID nº: 59, y SEC ID nº: 61, respectivamente.

[0290] Ejemplos de otras beta-glucosidasas útiles en la presente invención incluyen una proteína de fusión de variante de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de SEC ID nº: 64 o la proteína de fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* de SEC ID nº: 66.

Las proteínas de fusión de beta-glucosidasa de SEC ID nº: 64 y SEC ID nº: 66 se codifican por SEC ID nº: 63 y SEC ID nº: 65, respectivamente.

[0291] La beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* puede ser obtenida según WO 2002/095014.

La beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* puede ser obtenida según WO 2005/047499.

La beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* puede ser obtenida según WO 2007/019442.

La beta-glucosidasa de *Aspergillus niger* puede ser obtenida según Dan et al., 2000, J. Biol. Chem. 275: 4973-4980.

La beta-glucosidasa de *Aspergillus aculeatus* puede ser obtenida según Kawaguchi et al., 1996, Gene 173: 287-288.

[0292] Otras endoglucanasas útiles, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas se describen en numerosas familias de glicosil hidrolasa que utilizan la clasificación según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat B., y Bairoch A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0293] Otras enzimas celulolíticas que se pueden usar en la presente invención son descritas en WO 98/13465, WO 98/015619, WO 98/015633, WO 99/06574, WO 99/10481, WO 99/025847, WO 99/031255, WO 2002/101078, WO 2003/027306, WO 2003/052054, WO 2003/052055, WO 2003/052056, WO 2003/052057, WO 2003/052118, WO 2004/016760, WO 2004/043980, WO 2004/048592, WO 2005/001065, WO 2005/028636, WO 2005/093050, WO 2005/093073, WO 2006/074005, WO 2006/117432, WO 2007/071818, WO 2007/071820, WO 2008/008070, WO 2008/008793, patente estadounidense nº 5.457.046, patente estadounidense nº 5.648.263, y patente estadounidense nº 5.686.593.

[0294] En un aspecto, el polipéptido con actividad de mejora celulolítica se usa en la presencia de un catión metálico bivalente de activación soluble según WO 2008/151043, por ejemplo, sulfato de manganeso.

[0295] En otro aspecto, el polipéptido con actividad de mejora celulolítica se usa en presencia de un compuesto dioxo, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto con nitrógeno, un compuesto de quinona, un compuesto con sulfuro, o una solución obtenida de un material celulósico pretratado tal como rastrojos de maíz pretratados (PCS).

[0296] El compuesto dioxo puede incluir cualquier compuesto adecuado conteniendo dos o más átomos de oxígeno. En algunos aspectos, los compuestos dioxo contienen una fracción de arilo sustituido como se describe aquí. Los compuestos dioxo pueden comprender uno o más (por ejemplo; varios) hidroxilo y/o derivados de hidroxilo, pero también incluyen fracciones de arilo sustituido careciendo de hidroxilo y derivados hidroxilo.

Ejemplos no limitativos de los compuestos dioxo incluyen pirocatecol o catecol; ácido cafeico; ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 4-tert-butil-5-metoxi-1,2-bencenodiol; pirogalol; ácido gálico; metil-3,4,5-trihidroxibenzoato; 2,3,4-trihidroxibenzofenona; 2,6-dimetoxifenol; ácido sinapínico; ácido 3,5-dihidroxibenzoico; 4-cloro-1,2-bencenodiol; 4-nitro-1,2-bencenodiol; ácido tánico; galato de etilo; glicolato de metilo; ácido dihidroxifumarico; 2-butina-1,4-diol; (ácido crocónico; 1,3-propanodiol; ácido tartárico; 2,4-pentanodiol; 3-etoxi-1,2-propanodiol; 2,4,4'-trihidroxibenzofenona; cis-2-buteno-1,4-diol; 3,4-dihidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona; dihidroxiacetona; acroleína acetálica; metil-4-hidroxibenzoato; ácido 4-hidroxibenzoico; y metil-3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato; o una sal o solvato de la misma.

[0297] El compuesto bicíclico puede incluir cualquier sistema anular fusionado sustituido adecuado como se describe en este caso.

Los compuestos pueden comprender uno o más (por ejemplo; varios) anillos adicionales, y no se limitan a un número específico de anillos a menos que se declare lo contrario.

En un aspecto, el compuesto bicíclico es un flavonoide.

En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un isoflavonoide opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un ión de flavilio opcionalmente sustituido, tal como una antocianidina opcionalmente sustituida o antocianina opcionalmente sustituida, o su derivado.

Ejemplos no limitativos de los compuestos bicíclicos incluyen epicatequina; quercetina; miricetina; taxifolina; kaempferol; morina; acetina; naringenina; isoramnetina; apigenina; cianidina; cianina; kuromanina; keracianina; o una sal o solvato del mismo.

[0298] El compuesto heterocíclico puede ser cualquier compuesto adecuado, tal como un anillo aromático opcionalmente sustituido o no aromático que comprende un heteroátomo, como se describe en este caso.

En un aspecto, el heterocíclico es un compuesto que incluye una fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o una fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido.

En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituida o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituida es un heterocicloalquilo dividido en 5 miembros opcionalmente sustituido o una fracción de heteroarilo dividida en 5 miembros opcionalmente sustituida.

En otro aspecto, el heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituida es una fracción opcionalmente sustituida seleccionada de pirazolilo, furanilo, imidazolilo, isoxazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, pirrolilo, piridilo, pirimidilo, piridazinilo, tiazolilo, triazolilo, tienilo, dihidrotieno-pirazolilo, tianftenilo, carbazolilo, bencimidazolilo, benzotienilo, benzofuranilo, indolilo, quinoleínilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, benzimidazolilo, isoquinoleínilo, isoindolilo, acridinilo, benzoisazolilo, dimetilhidantoina, pirazinilo, tetrahydrofuranilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, morfino, indolilo, diazepinilo, azepinilo, tiepinilo, piperidinilo, y oxepinilo.

En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido es un furanilo opcionalmente sustituido.

Ejemplos no limitativos de los compuestos heterocíclicos incluyen (1,2-dihidroxietil)-3,4-dihidroxifuran-2(5H)-ona; 4-hidroxi-5-metil-3-furanona; 5-hidroxi-2(5H)-furanona; [1,2-dihidroxietil]furan-2,3,4(5H)-triona; α -hidroxi- γ -butirolactona; γ -lactona ribónica; ácido aldohexuronaldohexurónico γ -lactona; ácido glucónico δ -lactona; 4-hidroxicoumarina; dihidrobenzofurano; 5-(hidroximetil)furfural; furoina; 2(5H)-furanona; 5,6-dihidro-2H-piran-2-ona; y 5,6-dihidro-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona; o una sal o solvato de los mismos.

[0299] El compuesto que contiene nitrógeno puede ser cualquier compuesto adecuado con uno o varios átomos de nitrógeno.

En un aspecto, el compuesto que contiene nitrógeno comprende una fracción de amina, imina, hidroxilamina, o nitróxido.

Ejemplos no limitativos de los compuestos que contienen nitrógeno incluyen acetona oxima; ácido violúrico; piridina-2-aldoxima; 2-aminofenol; 1,2-bencenodiamina; 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinilo; 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina; 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahydropterina; y ácido maleámico; o una sal o solvato de los mismos.

[0300] El compuesto de quinona puede ser cualquier compuesto adecuado que comprende una fracción de quinona como se describe en este caso.

Ejemplos no limitativos de los compuestos de quinona incluyen 1,4-benzoquinona, 1,4-naftoquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona o coenzima Q₀, 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzoquinona o duroquinona; 1,4-dihidroxiantraquinona; 3-hidroxi-1-metil-5,6-indolinediona o adrenocromo; 4-tert-butil-5-metoxi-1,2-benzoquinona; pirroloquinolina quinona; o una sal o solvato de los mismos.

[0301] El compuesto que contiene sulfuro puede ser cualquier compuesto adecuado comprendiendo uno o varios átomos de azufre.

En un aspecto, el compuesto que contiene sulfuro comprende una fracción seleccionada de tionilo, tioéter, sulfinilo, sulfonilo, sulfamida, sulfonamida, ácido sulfónico, y éster sulfónico.

5 Ejemplos no limitativos de los compuestos que contienen sulfuro incluyen etanotiol; 2-propanotiol; 2-propeno-1-tiol; ácido 2-mercaptoetanesulfónico; bencenotiol; benceno-1,2-ditio; cisteína; metionina; glutatona; cistina; o una sal o solvato de los mismos.

[0302] En un aspecto, una cantidad eficaz de tal compuesto anteriormente descrito para material celulósico como una proporción molar para unidades glucosílicas de celulosa es aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10, por ejemplo, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 7.5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 2.5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 1, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 1, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-1} , aproximadamente 10^{-4} a aproximadamente 10^{-1} , aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-1} , o aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-2} .

En otro aspecto, una cantidad eficaz de tal compuesto anteriormente descrito es aproximadamente 0,1 μ M a aproximadamente 1 M, por ejemplo, aproximadamente 0,5 μ M a aproximadamente 0,75 M, aproximadamente 0,75 μ M a aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 0,25 M, aproximadamente 1 μ M a aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 μ M a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 10 μ M a aproximadamente 10 mM, aproximadamente 5 μ M a aproximadamente 5 mM, o aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 mM.

[0303] El término "licor" significa la fase de la solución, bien acuosa, orgánica, o una combinación de los mismos, que surgen del tratamiento de una lignocelulosa y/o material de hemicelulosa en un lodo, o monosacáridos de los mismos, por ejemplo, xilosa, arabinosa, manosa, etc., bajo condiciones como se describe aquí, y el contenido soluble de los mismos.

Un licor para realce celulolítico de un polipéptido GH61 se puede producir tratando una lignocelulosa o material de hemicelulosa (o materia prima) aplicando calor y/o presión, opcionalmente en presencia de un catalizador, por ejemplo, ácido, opcionalmente en presencia de un solvente orgánico, y opcionalmente en combinación con interrupción física del material, y luego separando la solución de los sólidos residuales.

Tales condiciones deciden el grado de realce celulolítico obtenible a través de la combinación de solución y un polipéptido GH61 durante la hidrólisis de un sustrato celulósico por una preparación con celulasa.

La solución se puede separar del material tratado que utiliza un método estándar en la técnica, tal como filtración, sedimentación, o centrifugación.

[0304] En un aspecto, una cantidad eficaz de la solución para celulosa es aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 10 g por g de celulosa, por ejemplo, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 7.5 g, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 5, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 2.5 g, aproximadamente 10^{-6} a aproximadamente 1 g, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 1 g, aproximadamente 10^{-5} a aproximadamente 10^{-1} g, aproximadamente 10^{-4} a aproximadamente 10^{-1} g, aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-1} g, o aproximadamente 10^{-3} a aproximadamente 10^{-2} g por g de celulosa.

[0305] En un aspecto, una o más (por ejemplo; varias) enzimas hemicelulolíticas comprenden una preparación enzimática hemicelulolítica comercial.

Ejemplos de preparaciones enzimáticas hemicelulolíticas comerciales adecuadas para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo, SHEARZYME™ (Novozymes A/S), CELLIC® HTec (Novozymes A/S), CELLIC® HTec2 (Novozymes A/S), VISCOZYME® (Novozymes A/S), ULTRAFLO® (Novozymes A/S), PULPZYME® HC (Novozymes A/S), MULTIFECT® Xylanase (Genencor), ACCELLERASE® XY (Genencor), ACCELLERASE® XC (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 Xylanase (DSM), DEPOL™ 333P (Biocatalysts Limit, Wales, UK), DEPOL™ 740L (Biocatalysts Limit, Wales, UK), y DEPOL™ 762P (Biocatalysts Limit, Wales, UK).

[0306] Ejemplos de xilanasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, xilanasas de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP:AAR63790 WO 94/21785), *Aspergillus fumigatus* (WO 2006/078256; Xyl 3 SEC ID n.º: 67 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 68 [secuencia de aminoácidos deducida]), *Penicillium pinophilum* (WO 2011/041405), *Penicillium* sp. (WO 2010/126772), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/079210), y *Trichophaea saccata* GH10 (WO 2011/057083).

[0307] Ejemplos de beta-xilosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* (número de acceso de UniProtKB/TrEMBL Q92458 SEC ID n.º: 69 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 70 [secuencia de aminoácidos deducida]), *Talaromyces emersonii* (número de acceso de SwissProt Q8X212), y *Neurospora crassa* (número de acceso de SwissProt Q7SOW4).

[0308] Ejemplos de acetilxilano esterasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, acetilxilano esterasas de *Aspergillus aculeatus* (WO 2010/108918), *Chaetomium globosum* (número de acceso de Uniprot Q2GWX4), *Chaetomium gracile* (número de acceso de GeneSeqP AAB82124), *Humicola*

insolens DSM 1800 (WO 2009/073709), *Hipocrea jecorina* (WO 2005/001036), *Myceliophthora thermophila* (WO 2010/014880), *Neurospora crassa* (número de accesión de UniProt q7s259), *Phaeosphaeria nodorum* (número de accesión de Uniprot Q0UJH1), y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 (WO 2009/042846).

5 [0309] Ejemplos de feruloil esterasas (esterasas de ácido ferúlico) útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, feruloil esterasas de *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2009/076122), *Neosartorya fischeri* (número de accesión de UniProt A1D9T4), *Neurospora crassa* (número de accesión de UniProt Q9HGR3), *Penicillium aurantiogriseum* (WO 2009/127729), y *Thielavia terrestris* (WO 2010/053838 y WO 2010/065448).

10 [0310] Ejemplos de arabinofuranosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, arabinofuranosidasas de *Aspergillus niger* (número de accesión de GeneSeqP AAR94170), *Humicola insolens* DSM 1800 (WO 2006/114094 y WO 2009/073383), y *M. giganteus* (WO 2006/114094).

15 [0311] Ejemplos de alfa-glucuronidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, alfa-glucuronidasas de *Aspergillus clavatus* (número de accesión de UniProt alcc12), *Aspergillus fumigatus* (número de accesión de SwissProt Q4WW45), *Aspergillus niger* (número de accesión de Uniprot Q96WX9), *Aspergillus terreus* (número de accesión de SwissProt Q0CJP9), *Humicola insolens* (WO 2010/014706), *Penicillium aurantiogriseum* (WO 2009/068565), *Talaromyces emersonii* (número de accesión de UniProt Q8X211), y *Trichoderma reesei* (número de accesión de Uniprot Q99024).

25 [0312] Los polipéptidos con actividad enzimática usados en los métodos de la presente invención se pueden producir por fermentación de las cepas microbianas mencionadas anteriormente en un medio nutritivo que contiene fuentes de nitrógeno y carbono adecuadas y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Bennett, J.W. y LaSure, L. (eds.), *More Gene Manipulations in Fungi*, Academic Press, CA, 1991).

Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la colección americana de cultivos tipo).

30 Rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para crecimiento y producción enzimática se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, Bailey, J.E., and Ollis, D.F., *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

[0313] La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula dando como resultado la expresión o aislamiento de una enzima o proteína.

35 La fermentación puede, por lo tanto, son entendida como que comprende cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, de lote, de lote alimentado, o de estado sólido) en los fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten a la enzima ser expresada o aislada.

Las enzimas resultantes producidas por los métodos anteriormente descritos se pueden recuperar del medio de fermentación y purificar por procedimientos convencionales.

40 [0314] Fermentación.

Los azúcares fermentables obtenidos del material celulósico hidrolizado se pueden fermentar por uno o más (por ejemplo; varios) microorganismos fermentadores capaces de fermentar los azúcares directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado. "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprende un paso de fermentación.

45 Procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación usados en la industria de alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria de cuero, e industria de tabaco.

50 Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y organismo fermentador y pueden fácilmente ser determinadas por un experto en la técnica.

[0315] En la etapa de fermentación, azúcares, liberados del material celulósico como resultado del pretratamiento y pasos de hidrólisis enzimática, se fermentan a un producto, por ejemplo, etanol, por un organismo fermentador, tal como levadura.

55 Hidrólisis (sacarificación) y fermentación pueden ser separadas o simultáneas, como se describe en este caso.

[0316] Cualquier material celulósico hidrolizado adecuado se puede usar en el paso de fermentación al poner en práctica la presente invención.

60 El material es generalmente seleccionado basado en el producto de fermentación deseado, es decir, la sustancia para ser obtenida de la fermentación, y el proceso empleado, como es bien conocido en la técnica.

[0317] El término "medio de fermentación" se entiende aquí para referirse a un medio antes de que el(los) microorganismo(s) de fermentación sea(sean) añadido(s), tal como, un medio resultante de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en una sacarificación simultánea y proceso de fermentación (SSF).

65 [0318] "Microorganismo fermentador" se refiere a cualquier microorganismo, incluyendo organismos bacterianos y

fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación deseado para producir un producto de fermentación. El organismo fermentador puede ser organismos fermentadores de hexosa y/o de pentosa, o una combinación de los mismos.

Los organismos fermentadores tanto de hexosa como de pentosa se conocen en la técnica. Microorganismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tal como glucosa, xilosa, xilulosa, arabinosa, maltosa, manosa, galactosa, y/o oligosacáridos, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

Ejemplos de organismos fermentadores bacterianos y fúngicos productores de etanol están descritos por Lin et al., 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

[0319] Ejemplos de microorganismos fermentadores que pueden fermentar azúcares de hexosa incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tal como levadura.

Levadura preferida incluye cepas de *Candida*, *Kluyveromyces*, y *Saccharomyces*, por ejemplo, *Candida sonorensis*, *Kluyveromyces marxianus*, y *Saccharomyces cerevisiae*.

[0320] Ejemplos de organismos fermentadores que pueden fermentar azúcares de pentosa en su estado nativo incluyen organismos bacterianos y fúngicos, tal como alguna levadura.

Levadura fermentadora de xilosa preferida incluyen cepas de *Candida*, preferiblemente *C. sheatae* o *C. sonorensis*; y cepas de *Pichia*, preferiblemente *P. stipitis*, tal como *P. stipitis* CBS 5773.

Levadura fermentadora de pentosa preferida incluye cepas de *Pachysolen*, preferiblemente *P. tannophilus*.

Organismos no capaces de fermentar los azúcares de pentosa, tal como xilosa y arabinosa, pueden ser genéticamente modificados para hacerlo por métodos conocidos en la técnica.

[0321] Ejemplos de bacterias que pueden fermentar eficazmente hexosa y pentosa a etanol incluyen, por ejemplo, *Bacillus coagulans*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium phytofermentans*, *Geobacillus*, sp. *Thermoanaerobacter saccharoliticum*, y *Zymomonas mobilis* (Philippidis, 1996, supra).

[0322] Otros organismos fermentadores incluyen cepas de *Bacillus coagulans*; *Candida*, such as *C. sonorensis*, *C. methanosorbosa*, *C. diddensiae*, *C. parapsilosis*, *C. naedodendra*, *C. blankii*, *C. entomophila*, *C. brassicae*, *C. pseudotropicalis*, *C. boidinii*, *C. utilis*, and *C. scheidtiae*; *Clostridium*, tal como *C. acetobutylicum*, *C. thermocellum*, y *C. phytofermentans*; *E. coli*, especialmente cepas de *E. coli* que se han modificado genéticamente para mejorar el rendimiento de etanol; *Geobacillus* sp.; *Hansenula*, tal como *Hansenula anomala*; *Klebsiella*, tal como *K. oxytoca*; *Kluyveromyces*, tal como *K. marxianus*, *K. lactis*, *K. thermotolerans*, y *K. fragilis*; *Schizosaccharomyces*, tal como *S. pombe*; *Thermoanaerobacter*, tal como *S. pombe*; *Thermoanaerobacter*, tal como *Thermoanaerobacter saccharoliticum*; y *Zymomonas*, tal como *Zymomonas mobilis*.

[0323] En un aspecto preferido, la levadura es un *Bretannomyces*.

En un aspecto más preferido, la levadura es *Bretannomyces clausenii*.

En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida sonorensis*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida boidinii*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida blankii*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida brassicae*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida diddensii*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida entomophiliia*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida pseudotropicalis*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida scheidtiae*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida utilis*.

En otro aspecto preferido, la levadura es una *Clavispora*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora lusitanae*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora opuntiae*.

En otro aspecto preferido, la levadura es un *Kluyveromyces*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces fragilis*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces marxianus*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromyces thermotolerans*.

En otro aspecto preferido, la levadura es una *Pachysolen*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Pachysolen tannophilus*.

En otro aspecto preferido, la levadura es una *Pichia*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es una *Pichia stipitis*.

En otro aspecto preferido, la levadura es una *Saccharomyces* spp.

En un aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces distaticus*.

En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces uvarum*.

[0324] En un aspecto preferido, la bacteria es una *Bacillus*.

En un aspecto más preferido, la bacteria es *Bacillus coagulans*.

En otro aspecto preferido, la bacteria es una *Clostridium*.
 En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Clostridium acetobutylicum*.
 En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Clostridium phytofermentans*.
 En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Clostridium thermocellum*.
 5 En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Geobacillus* sp.
 En otro aspecto más preferido, la bacteria es un *Thermoanaerobacter*.
 En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Thermoanaerobacter saccharoliticum*.
 En otro aspecto preferido, la bacteria es una *Zymomonas*.
 En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Zymomonas mobilis*.

10 [0325] Levadura disponible comercialmente adecuada para producción de etanol incluyen, por ejemplo, BIOFERM™ AFT and XR (NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, USA), ETHANOL RED™ yeast (Fermentis/Lesaffre, USA), FALI™ (Fleischmann's Yeast, USA), FERMIOL™ (DSM Specialties), GERT STRAND™ (Gert Strand AB, Suecia), y SUPERSTART™ y levadura fresca de THERMOSACC™ (Ethanol Technology, WI, USA).

15 [0326] En un aspecto preferido, el microorganismo fermentador ha sido genéticamente modificado para proporcionar la capacidad para fermentar azúcares de pentosa, tal como microorganismos que utilizan xilosa, que utilizan arabinosa, y y que utilizan xilosa y arabinosa.

20 [0327] La clonación de genes heterólogos en varios microorganismos fermentadores ha conducido a la construcción de organismos capaces de convertir hexosas y pentosas a etanol (co-fermentación) (Chen y Ho, 1993, Cloning and improving the expression of Pichia stipitis xylose reductase gene in Saccharomyces cerevisiae, Appl. Biochem. Biotechnol. 39-40: 135-147; Ho et al., 1998, Genetically engineered Saccharomyces yeast capable of effectively
 25 cofermenting glucose and xylose, Appl. Environ. Microbiol. 64: 1852-1859; Kotter y Ciriacy, 1993, Xylose fermentation by Saccharomyces cerevisiae, Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 776-783; Walfridsson et al., 1995, Xylose-metabolizing Saccharomyces cerevisiae strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase, Appl. Environ. Microbiol. 61: 4184-4190; Minimal metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle, FEMS Yeast Research 4: 655-664; Beall et al., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant Escherichia coli, Biotech. Bioeng. 38: 296-303; Ingram et al., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng. 58: 204-214; Zhang et al., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic Zymomonas mobilis, Science 267: 240-243; Deanda et al., 1996, Development of an arabinose-fermenting Zymomonas mobilis strain by metabolic pathway engineering,
 30 Appl. Environ. Microbiol. 62: 4465-4470; WO 2003/062430, xilosa isomerasa).

35 [0328] En un aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Candida sonorensis*.
 En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Escherichia coli*.
 En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Klebsiella oxytoca*.
 40 En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Kluyveromyces marxianus*.
 En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Saccharomyces cerevisiae*.
 En otro aspecto preferido, el microorganismo fermentador genéticamente modificado es *Zymomonas mobilis*.

45 [0329] Es bien conocido en la técnica que los organismos anteriormente descritos también pueden usarse para producir otras sustancias, como se describe aquí.

[0330] El microorganismo fermentador es típicamente añadido al material celulósico degradado o hidrolizado y la fermentación se realiza durante aproximadamente 8 a aproximadamente 96 horas, por ejemplo, aproximadamente 24 a aproximadamente 60 horas.

50 La temperatura es típicamente entre aproximadamente 26°C a aproximadamente 60°C, por ejemplo, aproximadamente 32°C o 50°C, y aproximadamente pH 3 a aproximadamente de pH 8, por ejemplo, pH 4-5, 6, o 7.

[0331] En un aspecto, la levadura y/o otro microorganismo se aplican al material celulósico degradado y la fermentación se realiza durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, tal como típicamente 24-60
 55 horas.

En otro aspecto, la temperatura es preferiblemente entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, por ejemplo, aproximadamente 25°C a aproximadamente 50°C, aproximadamente 32°C a aproximadamente 50°C, o aproximadamente 32°C a aproximadamente 50°C, y el pH es generalmente de aproximadamente pH 3 a aproximadamente de pH 7, por ejemplo, aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 7.

60 Sin embargo, algunos organismos fermentadores, por ejemplo, bacterias, tienen temperatura de fermentación más alta óptima.

Levadura u otro microorganismo es preferiblemente aplicado en cantidades de aproximadamente 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de aproximadamente 10^7 a 10^{10} , especialmente aproximadamente 2×10^8 concentración de células viables por ml de caldo de fermentación.

65 Otra guía con respecto al uso de levadura para fermentación se puede encontrar en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons y D.R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999).

[0332] Para producción de etanol, después de la fermentación del lodo fermentado se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido según los métodos de la invención se pueden usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables, o etanol industrial.

5 [0333] Un estimulador de fermentación se puede usar en combinación con cualquiera de los métodos descritos aquí para mejorar adicionalmente el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como, mejora del índice y rendimiento de etanol.

10 Un "estimulador de la fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentadores, en particular, levadura.

Estimuladores de fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales.

15 Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzóico, ácido fólico, riboflavina, y Vitaminas A, B, C, D, y E. Ver, por ejemplo, Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002).

Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que pueden suministrar nutrientes que comprenden P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn, y Cu.

20 [0334] Productos de fermentación: un producto de fermentación puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación.

25 El producto de fermentación puede ser, sin limitación, un alcohol (por ejemplo, arabinol, n-butanol, isobutanol, etanol, glicerol, metanol, etilenglicol, 1,3-propanodiol [propilenglicol], butanodiol, glicerina, sorbitol, y xilitol); un alcano (por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano, y dodecano), un cicloalcano (por ejemplo, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, y ciclooctano), un alqueno (por ejemplo penteno, hexeno, hepteno, y octeno); un aminoácido (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); un gas (por ejemplo, metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂), y monóxido de carbono (CO)); isopreno; una cetona (por ejemplo, de acetona); un ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico, y ácido xilónico); y policétido.

30 El producto de fermentación puede también ser proteína como un producto de valor alto.

[0335] En un aspecto preferido, el producto de fermentación es un alcohol.

Se entiende que el término "alcohol" abarca una sustancia que contiene una o más fracciones de hidroxilo.

35 En un aspecto más preferido, el alcohol es n-butanol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es isobutanol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es etanol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es metanol.

40 En otro aspecto más preferido, el alcohol es arabinol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es butanodiol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es etilenglicol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es glicerina.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es glicerol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es 1,3-propanodiol.

45 En otro aspecto más preferido, el alcohol es sorbitol.

En otro aspecto más preferido, el alcohol es xilitol.

Ver, por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., y Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, 65: 207-241; Silveira, M. M., y Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., y Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. y Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.

55 [0336] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un alcano.

El alcano puede ser un alcano no ramificado o ramificado.

En otro aspecto más preferido, el alcano es pentano.

En otro aspecto más preferido, el alcano es hexano.

En otro aspecto más preferido, el alcano es heptano.

60 En otro aspecto más preferido, el alcano es octano.

En otro aspecto más preferido, el alcano es nonano.

En otro aspecto más preferido, el alcano es decano.

En otro aspecto más preferido, el alcano es undecano.

En otro aspecto más preferido, el alcano es dodecano.

65 [0337] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un cicloalcano.

- En otro aspecto más preferido, el cicloalcano es ciclopentano.
 En otro aspecto más preferido, el cicloalcano es ciclohexano.
 En otro aspecto más preferido, el cicloalcano es cicloheptano.
 En otro aspecto más preferido, el cicloalcano es ciclooctano.
- 5 [0338] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un alqueno.
 El alqueno puede ser un no ramificado o un alqueno ramificado.
 En otro aspecto más preferido, el alqueno es penteno.
 En otro aspecto más preferido, el alqueno es hexeno.
- 10 En otro aspecto más preferido, el alqueno es hepteno.
 En otro aspecto más preferido, el alqueno es octeno.
- [0339] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un aminoácido.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido aspártico.
- 15 En otro aspecto más preferido, el aminoácido es ácido glutámico.
 En otro aspecto más preferido, el aminoácido es glicina.
 En otro aspecto más preferido, el aminoácido es lisina.
 En otro aspecto más preferido, el aminoácido es serina.
 En otro aspecto más preferido, el aminoácido es treonina.
- 20 Ver, por ejemplo, Richard, A., and Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 501-515.
- [0340] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un gas.
 En otro aspecto más preferido, el gas es metano.
- 25 En otro aspecto más preferido, el gas es H₂.
 En otro aspecto más preferido, el gas es CO₂.
 En otro aspecto más preferido, el gas es CO.
- Ver, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya, y K. Kiriya, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Science and Technology* 36 (6-7): 41-47; y Gunaseelan V.N. in *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.
- 30 [0341] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es isopreno.
- 35 [0342] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es una cetona.
 Se entiende que el término "cetona" abarca una sustancia que contiene una o más fracciones de cetona.
 En otro aspecto más preferido, la cetona es acetona.
 Ver, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, *supra*.
- 40 [0343] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un ácido orgánico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acético.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acetónico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido adípico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido ascórbico.
- 45 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido cítrico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido 2,5-diceto-D-glucónico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fórmico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fumárico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucárico.
- 50 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucónico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucurónico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glutárico.
 En otro aspecto preferido, el ácido orgánico es ácido 3-hidroxi propiónico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido itacónico.
- 55 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido láctico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido málico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido malónico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido oxálico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido propiónico.
- 60 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido succínico.
 En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido xilónico.
 Ver, por ejemplo, Chen, R., y Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448.
- 65 [0344] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es policétido.

[0345] Recuperación.

El(los) producto(s) de fermentación puede(n) ser opcionalmente recuperado(s) del medio de fermentación utilizando cualquier método conocido en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación, o extracción.

5 Por ejemplo, alcohol es separado del material celulósico fermentado y purificado por métodos convencionales de destilación.

Etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 vol.% puede ser obtenido, que se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables, o etanol industrial.

10 **Composiciones detergentes**

[0346] Los polipéptidos variantes que tienen actividad de mejora celulolítica de la presente invención se pueden adicionar y así volverse un componente de una composición de detergente.

15 [0347] La composición de detergente de la presente invención puede ser formulada, por ejemplo, como una composición de detergente para lavado de la ropa a mano o a máquina que incluye una composición de aditivo de lavandería adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante añadida al enjuague, o para ser formulada como una composición de detergente para usar en operaciones generales de limpieza de superficies duras del hogar, o ser formulada para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

[0348] En un aspecto específico, la presente invención proporciona un aditivo de detergente que comprende un polipéptido variante de la invención.

25 El aditivo de detergente al igual que la composición de detergente puede comprender una o más (por ejemplo; varias) enzimas tal como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasas, oxidasa, por ejemplo, una lacasa, y/o peroxidasa.

[0349] En general las propiedades de la(s) enzima(s) seleccionada(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

[0350] Celulasas: celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente por proteínas están incluidos.

35 Celulasas adecuadas incluyen celulasas del género *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0351] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color.

40 Ejemplos de tales celulasas son celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940.

Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como los descritos en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

45 [0352] Celulasas disponibles comercialmente incluyen CELLUZYME™, y CAREZYME™ (Novozymes A/S), CLAZINASE™, y PURADAX HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0353] Proteasas: proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano.

Origen microbiano es preferido.

50 Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos.

La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina.

Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en WO 89/06279).

55 Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0354] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, y 274.

[0355] Enzimas proteásicas disponibles comercialmente preferidas incluyen ALCALASE™, SAVINASE™, PRIMASE™, DURALASE™, ESPERASE™, y KANNASE™ (Novozymes A/S), MAXATASE™, MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™, PURAFECT™, OXP™ PURAFECT, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.).

65

[0356] Lipasas: lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos.

Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. Lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois et al., 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

[0357] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

[0358] Enzimas de lipasa disponibles comercialmente preferidas incluyen LIPOLASE™ y LIPOLASE ULTRA™ (Novozymes A/S).

[0359] Amilasas: amilasas adecuadas (α y/o β) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos.

Amilasas incluyen, por ejemplo, α -amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1.296.839.

[0360] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408, y 444.

[0361] Amilasas disponibles comercialmente son DURAMYL™, TERMAMYL™, FUNGAMYL™ y BAN™ (Novozymes A/S), RAPIDASE™ y PURASTAR™ (de Genencor International Inc.).

[0362] Peroxidasas/oxidadas: peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico.

Mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos.

Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

[0363] Peroxidasas disponibles comercialmente incluyen GUARDZYME™ (Novozymes A/S).

[0364] La(s) enzima(s) detergente(s) se pueden incluir en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más (por ejemplo; varias) enzimas, o añadiendo un aditivo combinado comprendiendo todas estas enzimas.

Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado, por ejemplo, como un granulado, líquido, lodo, etc. Formulaciones de aditivo de detergente preferidas son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lodos.

[0365] Granulados no en polvo se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US 4.106.991 y 4.661.452 y pueden opcionalmente ser recubiertos por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son productos de óxido de polietileno (polietilenoglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados teniendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di- y triglicéridos de ácidos grasos.

Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuadas para la aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591.

Preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos.

Enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.

[0366] La composición de detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, un comprimido, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido.

Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente conteniendo hasta 70% de agua y 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.

[0367] La composición de detergente comprende uno o más (por ejemplo; varios) tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos.

Los tensioactivos están típicamente presentes a un nivel de 0.1 % a 60% en peso.

[0368] Cuando se incluye en la misma el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un tensioactivo aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, éster metílico de

ácido graso alfa-sulfo, o ácido alquil o alqueniilsuccínico, o jabón.

[0369] Cuando se incluye aquí el detergente normalmente contendrá de aproximadamente 0.2% a aproximadamente 40% de un tensioactivo no iónico tal como etoxilato de alcohol, nonilfenol, alquilpoliglicósido etoxilato, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, polihidroxi alquil amida de ácido graso, o derivados N-alquilo N-acilo de glucosamina ("glucamidas").

[0370] El detergente puede contener 0-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético, ácido dietileno-triaminopentaacético, ácido alquil o alqueniilsuccínico, silicatos solubles, o silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst).

[0371] El detergente puede comprender uno o más (por ejemplo; varios) polímeros.

Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli (etilenglicol), alcohol polivinílico, poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poli(acrilatos), copolímeros de ácido maléico/acrílico, y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

[0372] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiletildenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato.

Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, el tipo amida, imida, o sulfona.

[0373] La(s) enzima(s) de la composición de detergente de la invención se puede(n) estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido borónico de fenilo tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708.

[0374] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tal como, por ejemplo, acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes suspensores de suciedad, agentes antirredeposición de suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrotropos, inhibidores de decoloración, o perfumes.

[0375] En las composiciones detergentes, cualquier enzima se puede adicionar en una cantidad que corresponde con 0.01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0.05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0.1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

[0376] En las composiciones detergentes, un polipéptido variante de la presente invención que tiene actividad de mejora celulolítica se puede adicionar en una cantidad que corresponde con 0.001-100 mg de proteína, preferiblemente 0.005-50 mg de proteína, más preferiblemente 0.01-25 mg de proteína, aún más preferiblemente 0.05-10 mg de proteína, de la forma más preferible 0.05-5 mg de proteína, e incluso de la forma más preferible 0.01-1 mg de proteína por litro de solución de lavado.

[0377] Un polipéptido variante de la presente invención que tiene actividad de mejora celulolítica también se puede incorporar en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202.

Plantas

[0378] La presente invención también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal, que comprende un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir la variante en cantidades recuperables.

La variante se puede recuperar de la planta o parte de planta.

Alternativamente, la planta o parte de planta que tiene la variante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejora del valor nutricional, palatabilidad, y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

[0379] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot).

Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de prados (poa pratense, Poa), hierba forrajera tal como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz (cereal).

[0380] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tal como coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0381] Ejemplos de partes de la planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutas, semillas, y tubérculos al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas.

5 Compartimentos de célula vegetal específica, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma están también considerados una parte de la planta.

Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera una parte de la planta.

10 Asimismo, partes de la planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de la planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semilla.

[0382] También se incluye dentro del campo de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de la planta, y células vegetales.

15 [0383] La planta transgénica o célula vegetal que expresa una variante se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye por la incorporación de uno o más (por ejemplo; varios) constructos de expresión que codifican una variante en el genoma huésped de la planta o genoma de cloroplasto y propagando la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

20 [0384] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica una variante operativamente enlazada con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de la planta de elección.

25 Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células vegetales en que el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para introducción del constructo en la planta en cuestión (el último depende del método de introducción de ADN para ser usado).

30 [0385] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias de promotor y de terminador y opcionalmente secuencias señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde, y cómo se desea que sea expresada la variante.

Por ejemplo, la expresión del gen que codifica una variante puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de fase o de tejido, y el producto génico puede ser previsto para un tejido específico o parte de la planta tal como semillas u hojas.

35 Secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, Plant Physiol. 86: 506.

[0386] Para expresión constitutiva, el 35S-CaMV, la ubiquitina-1 de maíz, y el promotor de actina de arroz 1 se pueden utilizar (Franck et al., 1980, Cell 21: 285-294; Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689; Zhang et al., 1991, Plant Cell 3: 1155-1165).

40 Promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutos (Edwards y Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semilla como la glutelina, prolamina, globulina, o promotor de albúmina de arroz (Wu et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrado et al., 1998, J. Plant Physiol. 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39: 935-941), el promotor *napA* de proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772.

45 Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcS* de arroz o tomate (Kyojuka et al., 1993, Plant Physiol. 102: 991-1000), el promotor de gen de adenina metiltransferasa del virus *chlorella* (Mittra y Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26: 85-93), el promotor del gen *aldP* de arroz (Kagaya et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 248: 668-674), o un promotor inducible de herida como el promotor *pin2* de patata (Xu et al., 1993, Plant Mol. Biol. 22: 573-588).

50 Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía, o alteraciones en la salinidad o inducidas por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico, y ácido giberélico, y metales pesados.

[0387] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir expresión más alta de una variante en la planta.

60 Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y el polinucleótido que codifica una variante.

Por ejemplo, Xu et al., 1993, supra, revelan el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

65 [0388] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de aquellas disponibles en la técnica.

[0389] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística, y electroporación (Gasser et al., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274).

5 [0390] Actualmente, la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicots transgénicas (para una revisión, ver Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y también pueden usarse para la transformación de monocots, aunque otros métodos de transformación son frecuentemente usados para estas plantas.

10 Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno recubierto con ADN transformante) de callos embriogénicos o para desarrollar embriones (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674).

15 Un método alternativo para transformación de monocots se basa en la transformación de protoplastos como se describe por Omirulleh et al., 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428.

Métodos de transformación adicionales para el uso conforme a la presente divulgación incluyen aquellos descritos en la patente estadounidense Nos. 6.395.966 y 7.151.204.

20 [0391] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separados o escisión específica del sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

25 [0392] Además de la transformación directa de un genotipo de planta particular con un constructo preparado según la presente invención, las plantas transgénicas pueden ser hechas cruzando una planta que tiene el constructo con una segunda planta que carece del constructo.

Por ejemplo, un constructo que codifica una variante se puede introducir en una variedad de planta particular cruzando, sin necesidad de transformar siempre directamente una planta de esta variedad dada.

30 Por lo tanto, la presente invención abarca no solo una planta directamente regenerada de células que han sido transformadas conforme a la presente invención, sino también la progenie de tales plantas.

Como se utiliza en este caso, progenie puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta progenitora preparada conforme a la presente invención.

35 Tal progenie puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención, o una porción de un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención.

El cruce resulta en la introducción de un transgen en una línea de planta por polinización cruzada de una línea precursora con una línea de planta donadora.

Ejemplos no limitativos de tales pasos están además articulados en la patente estadounidense nº 7.151.204.

40 [0393] Las plantas se pueden generar a través de un proceso de conversión por retrocruzamiento. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas referidas como un genotipo, línea, consanguínea, o híbrido convertido por retrocruzamiento.

45 [0394] Marcadores genéticos se pueden utilizar para asistir en la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un antecedente genético a otro.

La selección asistida por marcador ofrece ventajas con respecto al cultivo convencional en el que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas.

Además, marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruzamiento particular.

50 Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que sin embargo tiene un antecedente genético no deseable agrónomicamente se cruza con un progenitor de élite, los marcadores genéticos se pueden utilizar para seleccionar la progenie que no solo posee la característica de interés, sino que también tiene una proporción relativamente grande del germoplasma deseado.

55 De esta manera, el número de generaciones requerido para introgresión de uno o varios rasgos en un contexto genético particular es minimizado.

[0395] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una variante de la presente invención que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica la variante bajo condiciones propicias para la producción de la variante; y (b) recuperación de la variante.

60 [0396] La presente invención es posteriormente descrita por los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como limitando el ámbito de la invención.

Ejemplos

65

Medios

- 5 [0397] 2X placas YT fueron compuestas de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro sódico, 15 g de Bacto Agar, y agua desionizada hasta 1 litro.
- [0398] Placas PDA fueron compuestas de 39 g de agar de dextrosa de patata y agua desionizada hasta 1 litro.
- 10 [0399] Medio MDU2BP fue compuesto por 45 g de maltosa, 1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g de NaCl, 2 g de K_2HSO_4 , 12 g de KH_2PO_4 , 2 g de urea, 500 μ l de solución de metales traza AMG, y agua desionizada hasta 1 litro; el pH fue ajustado a 5.0 y luego esterilizado con filtro con una unidad de filtrado de 0.22 μ m.
- [0400] Solución de metales traza AMG fue compuesta por 14.3 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.5 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5 g de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 13.8 g de $FeSO_4 \cdot H_2O$, 8.5 g de $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g de ácido cítrico, y agua desionizada hasta 1 litro.
- 15 [0401] Medio M410 fue compuesto por 50 g de maltosa, 50 g de glucosa, 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g de KH_2PO_4 , 4 g de polvo de anhídrido de ácido cítrico, 8 g de extracto de levadura, 2 g de urea, 0.5 g de solución de metales traza AMG, 0.5 g de $CaCl_2$, y agua desionizada hasta 1 litro (pH 6.0).
- [0402] Medio LB fue compuesto por 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro sódico, y agua desionizada hasta 1 litro.
- 20 [0403] Placas LB fueron compuestas por 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro sódico, 15 g de Bacto-agar, y agua desionizada hasta 1 litro.
- 25 [0404] Medio YPG fue compuesto por 4 g de extracto de levadura, 1 g de K_2HPO_4 , 0.5 g de $MgSO_4$, 15.0 g de glucosa, y agua desionizada hasta 1 litro (pH 6.0).
- [0405] Medio YPM fue compuesto por 1% extracto de levadura, 2% peptona, y 2% maltodextrina.
Placas de SC agar fueron compuestas por 20 g de agar por litro de medio SC-URA.
- 30 [0406] Medio SC-URA con galactosa fue compuesto por 100 ml de 10X sales Basales, 25 ml de 20% ácidos de casamino sin vitaminas, 10 ml de 1% triptófano, 4 ml de 5% treonina (esterilizada con filtro, añadida después de autoclave), y 100 ml de 20% glucosa o 100 ml de 20% galactosa (esterilizada con filtro, añadida después de autoclave), y agua desionizada hasta 1 litro.
- 35 [0407] 10X solución de sales basales fue compuesta por 75 g de base nitrogenada de levadura, 113 g de ácido succínico, 68 g de NaOH, y agua desionizada hasta 1 litro.
- [0408] Medio YP fue compuesto por 10 g de extracto de levadura, 20 g de bacto-peptona, y agua desionizada hasta 1 litro.
- 40 [0409] Solución salina de COVE fue compuesta por 26 g de KCl, 26 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 76 g de KH_2PO_4 , 50 ml de solución de metales traza de COVE, y agua desionizada hasta 1 litro.
- 45 [0410] Solución de metales traza de COVE fue compuesta por 0.04 g de $NaB_4O_7 \cdot 10H_2O$, 0.4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1.2 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.7 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.8 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 10 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, y agua desionizada hasta 1 litro.
- [0411] Placas de COVE fueron compuestas por 342.3 g de sacarosa, 20 ml de solución salina de COVE, 10 ml de 1 M de acetamida, 10 ml de 1.5 M CsCl, 25 g de agar Noble (Difco), y agua desionizada hasta 1 litro.
- 50 [0412] Placas COVE2 fueron compuestas por 30 g de sacarosa, 20 ml de solución salina de COVE, 10 ml de 1 M acetamida, 25 g de agar Noble (Difco), y agua desionizada hasta 1 litro.
- 55 [0413] Solución de metales traza de *Trichoderma* fue compuesta por 216 g de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 58 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 27 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2.4 g de H_3BO_3 , 336 g de ácido cítrico, y agua desionizada hasta 1 litro.
- [0414] Medio CIM fue compuesto por 20 g de celulosa, 10 g de sólidos de maíz remojados, 1.45 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2.08 g de KH_2PO_4 , 0.28 g de $CaCl_2$, 0.42 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.42 ml de solución de metales traza de *Trichoderma*, 1-2 gotas de antiespumante, y agua desionizada hasta 1 litro; pH ajustado a 6.0.
- 60 **Ejemplo 1: Preparación de polipéptido GH61B de *Aspergillus fumigatus* que tiene actividad de mejora celulolítica**
- 65 [0415] Una búsqueda de blastn (Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402) de la secuencia de genoma parcial de *A. fumigatus* (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD, USA) fue realizada utilizando

como pregunta diferentes polipéptidos GH61 conocidos incluyendo el polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* (número de acceso de GeneSeqP AEC05922).

Diferentes genes fueron identificados como homólogos de familia GH61 putativa basados en un grado alto de similitud a las secuencias de pregunta a nivel aminoácido.

5 Una región genómica de aproximadamente 850 pb con más de 70% de identidad de secuencia a la secuencia polipeptídica GH61A de *Thermoascus aurantiacus* a nivel aminoácido fue elegida para otro estudio.

[0416] *A. fumigatus* NN051616 fue crecida y cosechada como se describe en la patente estadounidense nº 7.244.605.

10 Micelios congelados fueron molidos, por mortero y mano de mortero, hasta que un polvo fino y ADN genómico fue aislado utilizando una planta de DNEASY® Plant Maxi Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU) según instrucciones del fabricante.

[0417] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados abajo fueron diseñados para amplificar por PCR el gen de polipéptido GH61B de *A. fumigatus* de la familia del ADN genómico.

15 Un IN-FUSION® Cloning Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU) fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pAilo2 (WO 2004/099228), sin la necesidad de digestión por restricción y ligamiento.

Cebador directo:

20 5'-ACTGGATTTACCATGACTTTGTCCAAGATCACTTCCA-3' (SEC ID n.º: 71)

Cebador inverso:

5'-TCACCTCTAGTTAATTAAGCGTTGAACAGTGCAGGACCAG-3' (SEC ID n.º: 72)

Letras en negrita representan la secuencia codificante.

25 La secuencia restante es homóloga a los sitios de inserción de pAilo2.

[0418] Cinquenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción por PCR compuesta por 204 ng de ADN genómico de *A. fumigatus*, 1X Pfx Amplification Buffer (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU), 1,5 µl de un 10 mM mezcla de dATP, dTTP, dGTP, y dCTP, 2,5 unidades de PLATINUM® Pfx ADN polimerasa (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU), y 1 µl de 50 mM MgSO₄ en un volumen final de 50 µl.

30 La amplificación fue realizada utilizando un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 eppgradient S (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, EE.UU) programado para 1 ciclo a 94°C durante 3 minutos; y 30 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minutos.

El bloque de calor fue luego mantenido a 72°C durante 15 minutos seguido de un ciclo de remojo a 4°C.

35 [0419] Los productos reactivos fueron aislados por 1.0% electroforesis en gel de agarosa utilizando 40 mM base Tris -20 mM acetato de sodio-1 mM tampón de EDTA disódico (TAE) donde aproximadamente 850 bp de banda de producto fue extirpado del gel y purificado utilizando un MINELUTE® Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

40 [0420] El fragmento fue luego clonado en pAilo2 utilizando un IN-FUSION® Cloning Kit. El vector fue digerido con Nco I y Pac I.

El fragmento fue purificado por electroforesis en gel como se ha mencionado y un QIAQUICK® Gel Purification Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

45 El fragmento de gen y el vector digerido fueron combinados juntos en una reacción dando como resultado el plásmido de expresión pAG43 donde la transcripción del gen del polipéptido de la familia GH61B estaba bajo el control del promotor NA2-tpi.

El promotor NA2-tpi es un promotor modificado del gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

50 La reacción de recombinación (20 µl) fue compuesta por 1X IN-FUSION® Buffer (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU), 1X BSA (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU), 1 µl de enzima IN-FUSION® (diluido 1:10) (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU), 166 ng de pAilo2 digerido con Pac I y Nco I, y 110 ng del producto de PCR purificado del polipéptido GH61B de *A. fumigatus*.

La reacción fue incubada a 37°C durante 15 minutos seguidos de 15 minutos a 50°C.

55 La reacción fue diluida con 40 µl de un tampón de EDTA 10 mM Tris-0.1 M y 2.5 µl de la reacción diluida fueron usados para transformar células competentes de *E. coli* XL10 SOLOPACK® Gold (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Un transformante de *E. coli* que contiene pAG43 (gen de proteína GH61B) fue identificado por digestión de enzima de restricción y ADN plásmido fue preparado utilizando un BIROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

60 [0421] Secuenciación del ADN del fragmento de PCR de 862 pb fue realizada con un Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) de Applied Biosystems Modelo 377 XL (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EE.UU) usando química de terminador de coloración (Giesecke et al., 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60) y estrategia de paseos de cebadores.

Los cebadores específicos de vector siguientes fueron usados para la secuenciación:

65 pAilo2 5 SEC:

5'-TGTCCTTGTGCGATGCG 3' (SEC ID n.º: 73)

PALo2 3 SEC:

5'-CACATGACTTGGCTTCC 3' (SEC ID n.º: 74)

5 [0422] Datos de secuencia de nucleótidos fueron escrutinados por su calidad y todas las secuencias fueron comparadas entre sí con asistencia de software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).

[0423] Un modelo de gen para la secuencia de *A. fumigatus* fue construido basado en la similitud de la proteína codificada al polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* (número de acceso de GeneSeqP AEC05922).

10 La secuencia de nucleótidos (SEC ID n.º: 1) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n.º: 2) del gen de polipéptido GH61B de *A. fumigatus* se muestran en las Figuras 1A y 1B.

El fragmento genómico codifica un polipéptido de 250 aminoácidos, interrumpido por 2 intrones de 53 y 56 pb.

El % de contenido G+C del gen y la secuencia codificante madura son 53.9% y 57%, respectivamente.

15 Utilizando el programa de software SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 21 residuos fue predicho.

La proteína madura predicha contiene 221 aminoácidos con una masa molecular predicha de 23.39 kDa.

[0424] Protoplastos JaL355 de *Aspergillus oryzae* fueron preparados según el método de Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422.

20 Seis µg de pAG43 fueron usados para transformar JaL355 de *Aspergillus oryzae*.

Veintiséis transformantes fueron aislados a placas de PDA individuales.

[0425] Placas de PDA confluyentes de 24 transformantes fueron cada una lavada con 5 ml de 0.01% TWEEN® 20 y las esporas fueron recogidas cada una.

25 Ocho µl de cada materia prima de spora fueron adicionadas a 1 ml de medios YPG, YPM, y M410 separadamente en placas de 24 pocillos e incubadas a 34°C.

Después de 3 días de incubación, 7.5 µl de sobrenadante de cuatro transformantes fueron analizados utilizando un CRITERION® sin manchas, gel de SDS-PAGE de gradiente de 8-16% (IBio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

30 Basado en este gel, medio M410 fue elegido como el mejor medio.

Cinco días tras la incubación, 7.5 µl de sobrenadante de cada cultivo M410 fueron analizados utilizando un CRITERION® sin manchas, gel de SDS-PAGE de gradiente de 8-16%.

Perfiles de SDS-PAGE de los cultivos mostraron que diferentes transformantes tenían una nueva banda mayor de aproximadamente 25 kDa.

35 [0426] Una placa confluyente de un transformante (crecido en una placa PDA) se lavó con 5 ml de 0.01% TWEEN® 20 y se inoculó en cuatro matraces de Erlenmeyer de 500 ml conteniendo 100 ml de medio M410 para generar caldo para caracterización de la enzima.

40 Los matraces fueron cosechados en el día 5 (300 ml), filtrados utilizando un 0.22 µm EXPRESS™ Plus Membrane (Millipore, Bedford, MA, EE.UU), y almacenados a 4°C.

[0427] El caldo de matraz de agitación filtrado con el polipéptido GH61B de *A. fumigatus* recombinantemente producido que tiene actividad de mejora celulolítica fue primero concentrado por un concentrador de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU), tampón cambiado en 20 mM pH Tris-HCl 8.0, y luego purificado utilizando una columna de filtración en gel HIGHLOAD™ 26/60 SUPERDEX™ 75 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU) con un gradiente isocrático de 750 ml en 150 mM NaCl, 20 mM pH Tris-HCl 8.0.

Fracciones fueron recogidas y agrupadas basadas en análisis SDS-PAGE.

50 La concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, EE.UU) donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 2: Construcción de variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *Aspergillus fumigatus*

55 [0428] Una variante del polipéptido GH61B de *A. fumigatus* de tipo salvaje que tiene actividad de mejora celulolítica fue construida con las sustituciones L90V, D131S, M134L, y A141W.

La estructura de GH61 B de tipo salvaje de *A. fumigatus* del plásmido pAG43 (ejemplo 2) fue usada como modelo precursor sobre el cual las sustituciones fueron introducidas en diferentes pasos separados, generando productos intermedios hasta que se obtuvo el plásmido siguiente con las sustituciones de aminoácidos de objetivo finales: pTH230 (L90V + D131S + M134L + A141W).

60 Un QUIKCHANGE® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU) fue usado para generar las mutaciones por medio de reacciones mediadas por PCR donde pares de cebadores oligonucleótidos sintéticos, como se muestra en tabla 1, diseñados con los cambios objetivo fueron usados para incorporar las sustituciones deseadas.

65 [0429] Plásmido pTH228 de la variante fue generado utilizando el par de cebador inverso y directo 68339 y 68340 y pAG43 como el modelo precursor.

Plásmido pTH229 de la variante fue generado utilizando el par de cebador inverso y directo 68638 y 68639 y plásmido pTH228 de la variante como el modelo precursor.

Plásmido pTH230 de la variante fue generado utilizando el par de cebador inverso y directo 68640 y 68641 y plásmido pTH229 de la variante como el modelo precursor.

5 Tabla 1

Cambios aminoácidos	Cebador ID	Secuencia	Nombre de plásmido
L90V	68339	GGCTAACATAGCATAGGTGATTACTTACCTCGCTCC (SEC ID n.º: 75)	pTH228
	68340	GGAGCGAGGTAAGTAATCACCTATGCTATGTTAGCC (SEC ID n.º: 76)	
D131S, M134L	68638	CCTGGTGTGGGCTTCCGATGAACTGATCGCCAACAACAACACG (SEC ID n.º: 77)	pTH229
	68639	CGTGTGTTGTTGGCGATCAGTTCATCGGAAGCCCAAACACCAGG (SEC ID n.º: 78)	
A141W	68640	GCCAACAACAACACGTGGACAGTGACCATTCTGC (SEC ID n.º: 79)	pTH230
	68641	GCAGGAATGGTCACTGTCCACGTGTTGTTGTTGGC (SEC ID n.º: 80)	

[0430] Los ADNs de plásmido de mutante resultantes fueron preparados utilizando un BIOROBOT® 9600 y secuenciados utilizando un analizador genético 3130xl (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

10 **Ejemplo 3: Expresión de la variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *Aspergillus fumigatus* en *Aspergillus oryzae* JaL250**

[0431] Protoplastos de *Aspergillus oryzae* JaL250 (WO 99/61651) fueron preparados según el método de Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422, y transformados con 5 µg de pTH230 (o pAllo2 como un control).

15 La transformación liberó aproximadamente 20-25 transformantes.

Los transformantes fueron luego purificados de esporas a placas PDA selectivas individuales y luego crecieron en placas de cultivo de 24 pocillos conteniendo 1 ml de medio MDU2BP y se incubaron a 34°C fijos durante 5 días.

20 Muestras de caldo fueron cosechadas en el día 5 y analizadas por 8-16% Tris-glicina SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Una vez que los cultivos de cada transformante purificado de las esporas fueron confluyentes y habían esporulado, caldos de esporas fueron hechos aplicando 5 ml de TWEEN® 80 filtrados estériles al 0,01% (diluidos con agua destilada en vidrio) sobre el centro de cada placa PDA y utilizando un distribuidor estéril para raspar las esporas en la solución.

25 Caldos de esporas de los transformantes más productores para cada lote identificado por SDS-PAGE como teniendo bandas más oscuras en el peso molecular predicho de 26 kDa fueron usados para inocular un matraz de agitación de 2 litros conteniendo 300 ml de medio MDU2BP.

Frascos de agitación fueron incubados durante 5 días a 34°C con agitación a 220 r.p.m.

30 Después de la incubación, los caldos fueron filtrados estériles utilizando una membrana de polietersulfona de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, EE.UU) para purificación.

La cepa de *A. oryzae* identificada del análisis SDS-PAGE de los caldos del matraz de agitación con la banda más fuerte a 26 kDa fue designada TH169 (variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. Fumigatus*).

35 **Ejemplo 4: Purificación de la variante GH61B de *Aspergillus fumigatus* L90V + D131S + M134L + A141W**

[0432] La variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *Aspergillus fumigatus* recombinantemente producida fue primero concentrada por un concentrador de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU), tampón cambiado en 20 mM pH Tris-HCl 8.0, y luego purificado utilizando una columna Q-SEPHAROSE® High Performance de 75 ml (autoempaquetada) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU) con un gradiente lineal de NaCl de 800 ml 0-600 mM en 20 mM pH Tris-HCl 8.0.

Fraciones fueron recogidas y agrupadas basándose en el análisis SDS-PAGE.

La concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

45 **Ejemplo 5: Preparación de endoglucanasa II CEL5A de *Trichoderma reesei***

[0433] La familia del gen de endoglucanasa II GH5A de *Trichoderma reesei* (SEC ID n.º: 5 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 6 [secuencia de aminoácido deducido]) fue clonada en un vector de expresión de *Aspergillus oryzae* como se describe abajo.

50

- [0434] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos, mostrados a continuación, fueron diseñados para amplificar por PCR el gen de endoglucanasa II de ADN genómico RutC30 de *T. reesei*.
ADN genómico fue aislado utilizando un DNEASY® Plant Maxi Kit.
- 5 Un IN-FUSION™ PCR Cloning Kit fue usado para clonar el fragmento directamente en pAILo2 (WO 2004/099228).
Cebador directo:
5'-ACTGGATTTACCATGAACAAGTCCGTTGGCTCCATTGCT-3' (SEC ID n.º: 81)
- Cebador inverso:
10 5'-TCACCTCTAGTTAATTA**ACTACTTTCTTGGAGACAG**-3' (SEC ID n.º: 82)
Las letras en negrita representan una secuencia codificante.
La secuencia restante contiene identidad de secuencia comparada con los sitios de inserción de pAILo2 (WO 2004/099228).
- 15 [0435] Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción por PCR compuesta por 200 ng de ADN genómico de *T. reesei*, 1X Pfx Amplification Buffer, 6 µl de una mezcla 10 mM de dATP, dTTP, dGTP, y dCTP, 2,5 unidades de PLATINUM® Pfx ADN polimerasa, y 1 µl de 50 mM MgSO4 en un volumen final de 50 µl.
La reacción de amplificación fue incubada en un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, EE.UU) programado para 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos; y 35 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 30 segundos, y 68°C durante 1.5 minutos.
20 Después de los 35 ciclos, la reacción fue incubada a 68°C durante 10 minutos y luego enfriada a 10°C.
Un producto de reacción por PCR de 1.5 kb fue aislado en un gel de agarosa de GTG® al 0.8% (Cambrex Bioproducts, Rutherford, NJ, EE.UU) usando tampón TAE y 0,1 µg de bromuro de etidio por ml.
- 25 La banda de ADN fue visualizada con la ayuda de un DARKREADER™ (Clare Chemical Research, Dolores, CO, USA).
La banda de ADN de 1,5 kb fue cortada con una cuchilla de afeitar desechable y purificada utilizando una centrifugadora ULTRAFREE® DA (Millipore, Billerica, MA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.
- 30 [0436] Plásmido pAILo2 fue linealizado por digestión con Nco I y Pac I.
El fragmento de plásmido fue purificado por electroforesis en gel y ultrafiltración como se ha descrito anteriormente.
La clonación del fragmento de PCR purificado en el vector pAILo2 linealizado y purificado fue realizada utilizando un IN-FUSION™ PCR Cloning Kit.
La reacción (20 µl) contenía enzima 1X IN-FUSION™ Buffer, 1X BSA, 1 µl of IN-FUSION™ (diluido 1:10), 100 ng de pAILo2 digerido con Pac I y Nco I, y 100 ng del producto de PCR de endoglucanasa II CEL5A de *T. reesei*.
- 35 La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Una muestra de 2 µl de la reacción fue usada para transformar células competentes de *E. coli* XL10 SOLOPACK® Gold según las instrucciones del fabricante.
Después de un periodo de recuperación, dos partes alícuotas de 100 µl de la reacción de transformación fueron colocadas en placas sobre placas 2X YT de 150 mm suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml.
40 Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.
Un conjunto de 3 clones recombinantes putativos fue recuperado de las placas de selección y ADN plásmido fue obtenido a partir de cada uno utilizando un BIOROBOT® 9600.
Clones fueron analizados por digestión de restricción de *Pci* I/*Bsp* LU11 I.
- 45 Un clon con el modelo de digestión de restricción previsto fue luego secuenciado para confirmar que no había mutaciones en el inserto clonado.
Clon #3 fue seleccionado y designado pAILo27.
- [0437] Los protoplastos de JaL250 de *Aspergillus oryzae* (WO 99/61651) fueron preparados según el método de Christensen et al., 1988, supra, y transformados con 5 µg de pAILo27 (o pAILo2 como un control).
50 La transformación liberó aproximadamente 50 transformantes.
Once transformantes fueron aislados a placas PDA individuales e incubados durante cinco días a 34°C.
- [0438] Placas de esporas confluyentes fueron lavadas con 3 ml de 0.01% TWEEN® 80 y la suspensión de esporas fue usada para inocular 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml.
55 Cultivos transformantes fueron incubados a 34°C con agitación constante a 200 r.p.m.
Al quinto día post-inoculación, los cultivos fueron centrifugados a 6000 x g y sus sobrenadantes fueron recogidos.
Cinco microlitros de cada sobrenadante fueron mezclados con un volumen igual de 2X tampón de carga (10% beta-mercaptoetanol) y cargado sobre 1.5 mm 8%-16% gel de SDS-PAGE Tris-glicina y manchado con SIMPLYBLUE™ SafeStain (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).
60 Perfiles de SDS-PAGE de los caldos de cultivo mostraron que diez de once transformantes produjeron una banda proteínica nueva de aproximadamente 45 kDa.
Transformante número 1, designado *Aspergillus oryzae* JaL250AILo27, fue cultivado en un fermentador.
- 65 [0439] Medio de matraz de agitación fue compuesto por 50 g de sacarosa, 10 g de KH₂PO₄, 0.5 g de CaCl₂, 2 g de MgSO₄·7H₂O, 2 g de K₂SO₄, 2 g de urea, 10 g de extracto de levadura, 2 g de ácido cítrico, 0.5 ml de solución de

metales traza, y agua desionizada hasta 1 litro.

La solución de metales traza fue compuesta por 13.8 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14.3 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3 g de ácido cítrico, y agua desionizada hasta 1 litro.

5 [0440] Cien ml de medio de matraz de agitación fueron añadidos a un matraz de agitación de 500 ml. El matraz de agitación fue inoculado con dos tapones de JaL250A1Lo27 de *A. oryzae* de una placa PDA e incubado a 34°C en una coctelera orbital a 200 r.p.m. durante 24 horas. Cincuenta ml del caldo de matraz de agitación fueron usados para inocular un vaso de fermentación de 3 litros.

10 [0441] Medio de lote de fermentación fue compuesto por 10 g de extracto de levadura, 24 g de sacarosa, 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g de KH_2PO_4 , 0.5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g de ácido cítrico, 2 g de K_2SO_4 , 0.5 ml de anti espuma, 0.5 ml de solución de metales traza, y agua desionizada hasta 1 litro.

La solución de metales traza fue compuesta por 13.8 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14.3 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 3 g de ácido cítrico, y agua desionizada hasta 1 litro.

15 El medio de suministro de fermentación estaba compuesto de maltosa.

[0442] Un total de 1,8 litros del medio de lote de fermentación se añadió a un fermentador cubierto de vidrio de tres litros de Applikon Biotechnology (Applikon Biotechnology, Inc., Foster City, CA, USA).

Medio de suministro de fermentación fue dosificado a razón de 0 a 4,4 g/l/hr durante un periodo de 185 horas.

20 El vaso de fermentación fue mantenido a una temperatura de 34°C y el pH fue controlado utilizando un sistema de control de Applikon 1030 Applikon Biotechnology, Inc., Foster City, CA, EE.UU) a un punto de ajuste de 6.1 +/- 0.1.

Aire se añadió al vaso a razón de 1 vvm y el caldo fue agitado por impulsor Rushton rotativo a 1100 a 1300 r.p.m.

Al final de la fermentación, todo el caldo fue cosechado del vaso y centrifugado a 3000 x g para eliminar la biomasa.

El sobrenadante fue filtrado estéril utilizando 0,22 μm EXPRESS™ Plus Membrane, y almacenado a 4°C.

25 [0443] El sobrenadante fue desalado y cambiado de tampón en 20 mM pH Tris-HCl 8.0 utilizando una columna de desalación de 400 ml SEPHADEX™ G25 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

Endoglucanasa II CEL5A desalada de *Trichoderma reesei* fue cargada sobre una columna de intercambio iónico MONOQ™ 16/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU) y eluida con 300 ml de gradiente de NaCl lineal 0-300 mM en 20 mM pH Tris-HCl 8 con colección de fracciones de 10 ml .

Fracciones fueron agrupadas basándose en análisis SDS-PAGE.

La concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como una proteína estándar.

35 **Ejemplo 6: Preparación de beta-glucosidasa GH3A de *Aspergillus fumigatus***

[0444] Una beta-glucosidasa GH3A de *A. fumigatus* (SEC ID n.º: 55 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 56 [secuencia de aminoácido deducida]) fue preparada según la patente de estadounidense n.º 7.244.605.

40 La concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 7: Preparación de celobiohidrolasa I Cel7A de *Aspergillus fumigatus* NN055679

45 [0445] Una búsqueda tfasty (Pearson et al., 1997, Genomics 46:24-36) de la secuencia de genoma parcial de *A. fumigatus* (The Institute for Genomic Research, Rockville, MD, EE.UU) fue realizada utilizando como pregunta una secuencia de proteína de celobiohidrolasa Cel7 de *Trichoderma reesei* (accesión n.º P00725).

Diferentes genes fueron identificados como homólogos de familia putativa GH7 basándose en un grado alto de similitud a la secuencia de pregunta a nivel aminoácido.

50 Una región genómica con identidad de secuencia significativa a la secuencia de pregunta fue elegida para otro estudio, y el gen correspondiente fue denominado cel7A.

[0446] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR el gen de celobiohidrolasa I cel7A de *A. fumigatus* NN055679 (SEC ID n.º: 49 [secuencia de ADN] Y SEC ID n.º: 50 [secuencia de aminoácidos deducida]) de ADN genómico de *A. fumigatus* preparado como se describe en WO 2005/047499.

Cebador directo:

5'-gggcATGCTGGCCTCCACCTTCTCC-3' (SEC ID n.º: 83)

60 Cebador inverso:

5'-gggtaattaaCTACAGGCACTGAGAGTAA-3' (SEC ID n.º: 84)

[0447] Las mayúsculas representan la secuencia codificante.

65 El resto de la secuencia proporciona sitios de restricción de endonucleasa para Sph I y Pac I en las secuencias directa e inversa, respectivamente.

Utilizando estos cebadores, el gen cel7A de *A. fumigatus* fue amplificado utilizando los métodos de PCR estándar y

el producto de reacción aislado por 1% electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE y purificado utilizando un QIAQUICK® Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

5 [0448] El fragmento fue digerido con Sph I y Pac I y ligado en el vector de expresión pAIlO2 también digerido con Sph I y Pac I según procedimientos estándar.
Los productos de ligamiento fueron transformados en células competentes de *E. coli* XL10 SOLOPACK® Gold según las instrucciones del fabricante.
Un transformante de *E. coli* con un plásmido del tamaño correcto fue detectado por digestión de restricción y ADN plásmido fue preparado utilizando un BIOROBOT® 9600.
10 Secuenciación del ADN del inserto de este plásmido fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado de Perkin-Elmer Applied Biosystems Modelo 377 XL (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE.UU) usando química de terminador de coloración (Giesecke et al., 1992, supra) y estrategia de paseos de cebadores.
Datos de la secuencia de nucleótidos fueron escrutinados para calidad y todas las secuencias fueron comparadas entre sí con asistencia de software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, USA).
15 La secuencia de nucleótidos mostró que correspondía con la secuencia genómica determinada por TIGR (SEC ID n.º: 49 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 50 [secuencia de aminoácido deducida]).
El plásmido resultante fue denominado pEJG93.

20 [0449] Protoplastos JaL250 de *Aspergillus oryzae* fueron preparados según el método de Christensen et al., 1988, supra, y transformados con 5 µg de pEJG93 (así como pAIlO2 como un control de vector).
La transformación liberó aproximadamente 100 transformantes.
Diez transformantes fueron aislados a placas PDA individuales.

25 [0450] Placas PDA confluyentes de cinco de los diez transformantes fueron lavadas con 5 ml de 0,01% TWEEN® 20 e inoculadas separadamente en 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml e incubadas a 34°C, 250 r.p.m.
Cinco días después de la incubación, 0,5 µl de sobrenadante de cada cultivo fue analizado utilizando los geles de SDS-PAGE tris-glicina 8-16% (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.
30 Perfiles de SDS-PAGE de los cultivos mostraron que uno de los transformantes tuvo una gran banda de aproximadamente 70 kDa.
Este transformante fue denominado JaL250EJG93 de *A. oryzae*.

[0451] Cien ml de medio de matraz de agitación (ejemplo 5) fueron añadidos a un matraz de agitación de 500 ml .
35 El matraz de agitación fue inoculado con dos tapones de JaL250EJG93 de *A. oryzae* de una placa PDA e incubado a 34°C en una coctelera orbital a 200 r.p.m. durante 24 horas.
Cinuenta ml del caldo de matraz de agitación fue usado para inocular un vaso de fermentación de 3 litros.

[0452] Un total de 1.8 litros del medio de lote de fermentación (ejemplo 5) se añadió a un fermentador cubierto de vidrio de tres litros de Applikon Biotechnology.
40 Medio de suministro de fermentación (ejemplo 5) fue dosificado a razón de 0 a 4.4 g//hr durante un periodo de 185 horas.
El vaso de fermentación fue mantenido a una temperatura de 34°C y el pH fue controlado utilizando un sistema de control de Applikon 1030 a un punto de ajuste de 6.1 +/- 0.1.
Se añadió aire al vaso a razón de 1 vvm y el caldo fue agitado por impulsor Rushton rotativo a 1100 a 1300 r.p.m.
45 Al final de la fermentación, el caldo completo fue cosechado del vaso y centrifugado a 3000 x g para eliminar la biomasa.
El sobrenadante fue filtrado estéril utilizando un 0.22 µm EXPRESS™ Plus Membrane, y almacenado a 4°C.

[0453] Caldo filtrado fue concentrado y el tampón cambiado utilizando un concentrador de flujo tangencial (pPall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) con 20 mM pH Tris-HCl 8., y luego purificado utilizando una columna Q-SEPHAROSE® High Performance (autoempaquetada) de 75 ml (con un 750 ml 0-600 mM gradiente lineal de NaCl en 20 mM pH Tris-HCl 8.0 con colección de 10 ml fracciones).
50 Las fracciones fueron agrupadas basándose en análisis SDS-PAGE.
Concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.
Ejemplo 8: preparación de celobiohidrolasa II Cel6A de *Aspergillus fumigatus*

60 [0454] Celobiohidrolasa II de *A. fumigatus* NN055679 (CBHII) (SEC ID n.º: 51 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 52 [secuencia de aminoácido deducido]) fue preparada según el procedimiento siguiente.

[0455] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos, mostrados a continuación, fueron diseñados para amplificar por PCR el marco de lectura abierto en toda su longitud de la glicosil hidrolasa de la Familia 6A de *A. fumigatus* de ADN genómico.
65 Un equipo de clonación de TOPO® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU) fue usado para clonar el producto PCR.

Un IN-FUSION™ Cloning Kit fue usado para clonar el fragmento en pAIIo2.

Cebador directo:

5'-ACTGGATTTACCATGAAGCACCTTGCATCTTCCATCG-3' (SEC ID n.º: 85)

5 Cebador inverso:

5'-TCACCTCTAGTTAATTA**AAAGGACGGGTTAGCGT**-3' (SEC ID n.º: 86)

Letras en negrita representan la secuencia codificante.

La secuencia restante contiene identidad de secuencia comparada con los sitios de inserción de pAIIo2.

10 [0456] Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción por PCR compuesta por 500 ng de ADN genómico de *A. fumigatus*, tampón de reacción 1X ThermoPol Taq (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU), 6 µl de un 10 mM mezcla de dATP, dTTP dGTP, y dCTP, 0,1 unidad de Taq DNA-polimerasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU), en un volumen final de 50 µl.

15 Un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 fue usado para amplificar el fragmento programado para 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos; y 35 ciclos cada a 96°C durante 30 segundos, 61°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2 minutos.

Después de los 35 ciclos, la reacción fue incubada a 72°C durante 10 minutos y luego enfriada a 10°C hasta ser procesada adicionalmente.

20 Para eliminar las colas A producidas por Taq ADN polimerasa la reacción fue incubada durante 10 minutos a 68°C en presencia de 1 unidad de Pfx ADN polimerasa (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

[0457] Un producto de reacción por PCR de 1.3 kb fue aislado en un gel de GTG-agarosa al 0.8% (Cambrex Bioproducts, East Rutherford, NJ, EE.UU) usando tampón TAE y 0.1 µg de bromuro de etidio por ml.

25 La banda de ADN fue visualizada con la ayuda de un DARK READER™ (Clare Chemical Research, Dolores, CO, EE.UU) para evitar mutaciones inducidas por UV.

La banda de ADN de 1.3 kb fue cortada con una hoja de afeitar desechable y purificada con una centrifugadora ULTRAFREE® DA según las instrucciones del fabricante.

30 [0458] El producto de PCR purificado de 1,3 kb fue clonado en el pCR®4Blunt-TOPO® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

Dos microlitros del producto de PCR purificado fueron mezclados con 1 µl de una solución de cloruro sódico de 2 M y 1 µl del vector de pCR®4Blunt-TOPO®.

35 La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego 2 µl de la reacción fueron usados para transformar células competentes TOP10 de *E. coli* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

Dos partes alícuotas de 100 microlitros cada una de la reacción de transformación fueron difundidas sobre dos placas de 150 mm 2X YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml e incubadas durante toda la noche a 37°C.

40 [0459] Ocho colonias recombinantes fueron usadas para inocular cultivos líquidos conteniendo 3 ml de medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml.

ADN plásmido fue obtenido a partir de estos cultivos utilizando un BIOROBOT® 9600.

Clones fueron analizados por digestión de restricción.

45 ADN plásmido de cada clon fue digerido con Eco RI y analizado por electroforesis en gel de agarosa como anteriormente.

Seis de ocho clones tuvieron el modelo de digestión de restricción previsto y los clones 2, 4, 5, 6,7 y 8 fueron secuenciados para confirmar que no había mutaciones en el inserto clonado.

El análisis de secuencias de sus extremos 5-prima y 3-prima indicó que los clones 2, 6 y 7 tuvieron la secuencia correcta.

50 Estos tres clones fueron seleccionados para la reclonación en pAIIo2.

Un microlitro alícuota de cada clon fue mezclado con 17 µl de 1:10 diluido 0.1 mM EDTA-10 mM Tris pH 7.4 y 1 µl de esta mezcla fue usada para reamplificar la región codificante de glicosil hidrolasa 6A de *A. fumigatus*.

55 [0460] Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción por PCR compuesta por 1 µl de la mezcla diluida de clones 2,6 y 7,1X Pfx tampón de amplificación, 6 µl de una mezcla 10 mM de dATP, dTTP dGTP, y dCTP, 2,5 unidades de PLATINUM® Pfx DNA polimerasa, 1 µl de 50 mM MgSO₄, en un volumen final de 50 µl.

60 Un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 fue usado para amplificar el fragmento programado para 1 ciclo a 98°C durante 2 minutos; y 35 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 30 segundos, y 68°C durante 1.5 minutos.

Después de los 35 ciclos, la reacción fue incubada a 68°C durante 10 minutos y luego enfriada a 10°C hasta ser procesada adicionalmente.

Un producto de reacción por PCR de 1.3 kb fue aislado en un gel de GTG-agarosa al 0.8% usando tampón TAE y 0.1 µg de bromuro de etidio por ml.

65 La banda de ADN fue visualizada con la ayuda de un transiluminador de DARKREADER™ para evitar mutaciones inducidas por UV.

La banda de ADN de 1.3 kb fue cortada del gel con una hoja de afeitar desechable y purificada con una centrifugadora ULTRAFREE® DA según las instrucciones del fabricante.

[0461] El vector pAIlO2 fue linealizado por digestión con *Pac I* y *Nco I*.

5 El fragmento fue purificado por electroforesis en gel y ultrafiltración como se ha descrito anteriormente.

La clonación del fragmento de PCR purificado en el vector pAIlO2 linealizado y purificado fue realizada con un IN-FUSION™ Cloning Kit.

La reacción (20 µl) se compuso de 1X IN-FUSION™ Buffer, 1X BSA, 1 µl de enzima IN-FUSION™ (diluida 1:10), 100 ng de pAIlO2 digerido con *Pac I* y *Nco I*, y 50 ng del producto de PCR purificado de GH6A de *A. fumigatus*.

10 La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Una muestra de 2 µl de la reacción fue usada para transformar células competentes TOP10 de *E. coli* según las instrucciones del fabricante.

Después del periodo de recuperación, dos partes alícuotas de 100 µl de la reacción de transformación fueron colocadas en placas sobre placas de 150 mm 2X YT suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml.

15 Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C.

Un conjunto de ocho clones recombinantes putativos fue seleccionado al azar de las placas de selección y ADN plásmido fue preparado a partir de cada una utilizando un BIOROBOT® 9600.

Clones fueron analizados por digestión de restricción *Pst I*.

Siete de ocho clones tuvieron el modelo de digestión de restricción previsto.

20 Clones 1, 2 y 3 fueron luego secuenciados para confirmar que no había mutaciones en el inserto clonado.

Clon #2 fue seleccionado y designado pAIlO33.

[0462] Protoplastos JaL355 de *Aspergillus oryzae* fueron preparados según el método de Christensen et al., 1988, supra, y transformado con 5 µg de pAIlO33 (así como pAIlO2 como un control de vector).

25 La transformación liberó aproximadamente 100 transformantes.

Diez transformantes fueron aislados en placas PDA individuales.

[0463] Placas PDA confluyentes de cinco de los diez transformantes fueron lavadas con 5 ml de 0.01% TWEEN® 20 e inoculadas separadamente en 25 ml de medio MDU2BP en 125 ml frascos de agitación de vidrio e incubadas a 34°C, 250 r.p.m.

30 Cinco días tras la incubación, 0.5 µl de sobrenadante de cada cultivo fue analizado utilizando geles de Tris-Glicina SDS-PAGE al 8-16% (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

Los perfiles de SDS-PAGE de los cultivos mostraron que uno de los transformantes tuvo una gran banda de aproximadamente 70 kDa.

35 Este transformante fue denominado JaL355 AIlO33 de *A. oryzae*.

[0464] Cien ml de medio de matraz de agitación (ejemplo 5) se añadieron a un matraz de agitación de 500 ml.

El matraz de agitación fue inoculado con dos tapones de JaL355 AIlO33 de *A. oryzae* de una placa PDA e incubado a 34°C en un agitador orbital a 200 r.p.m. durante 24 horas.

40 Cincuenta ml del caldo de matraz de agitación fue usado para inocular un vaso de fermentación de 3 litros.

[0465] Un total de 1.8 litros del medio de lote de fermentación (ejemplo 5) se añadió a un fermentador cubierto de vidrio de tres litros de Applikon Biotechnology.

45 Medio de suministro de fermentación (ejemplo 5) fue dosificado a razón de 0 a 4.4 g//hr durante un periodo de 185 horas.

El vaso de fermentación fue mantenido a una temperatura de 34°C y el pH fue controlado utilizando un sistema de control Applikon 1030 a un punto de ajuste de 6.1 +/- 0.1.

Aire se añadió al vaso a razón de 1 vvm y el caldo fue agitado por impulsor Rushton girando a 1100 a 1300 r.p.m.

50 Al final de la fermentación, el caldo completo fue cosechado del vaso y centrifugado a 3000 x g para eliminar la biomasa.

El sobrenadante fue filtrado estéril utilizando 0.22 µm EXPRESS™ Plus Membrane, y almacenado a 4°C.

[0466] El caldo fue filtrado utilizando un filtro de vidrio GF/F de 0.7 µm (Whatman, Piscataway, NJ, EE.UU) y luego utilizando un EXPRESS™ Plus Membrane 0.22 µm.

55 El caldo filtrado fue concentrado y el tampón cambiado utilizando un concentrador de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) con 20 mM pH Tris-HCl 8.0.

[0467] Caldo desalado fue cargado sobre una columna de intercambio iónico MONOQ™ 16/10 y eluido con un gradiente de NaCl lineal de 300 ml 0-300 mM en 20 mM pH Tris-HCl 8 con colección de fracciones de 10 ml.

60 Las fracciones fueron agrupadas basándose en análisis SDS-PAGE.

Fracciones agrupadas fueron ajustadas a 1.2 M (NH₄)₂SO₄ en 20 mM Tris, pH 8.0 y luego aplicadas a una columna PHENYL SEPHAROSE™ FAST-FLOW® HIGH-SUB® autovertida de 75 ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU) y eluidas con un gradiente de (NH₄)₂SO₄ lineal de 750 ml 1.2-0 M en 20 mM Tris-HCl pH 8 con colección de fracciones de 10 ml.

65 Fracciones agrupadas basadas en SDS-PAGE fueron concentradas utilizando un concentrador centrífugo MWCO

VIVASPIN® de 10 kDa (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EEUU).

El material concentrado fue luego purificado utilizando una columna de filtración en gel HIGHLOAD™ 26/60 Superdex 75 con un gradiente isocrático de 200 ml en 150 mM NaCl, 20 mM pH Tris-HCl 8.0.

5 Las fracciones fueron recogidas y agrupadas basándose en SDS-PAGE y concentradas utilizando concentradores centrífugos MWCO VIVASPIN® de 10 kDa.

Concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

10 **Ejemplo 9: Preparación de xilanasa GH10 de *Aspergillus fumigatus***

[0468] Xilanasa GH10 de NN055679 de *Aspergillus fumigatus* (xyn3 SEC ID n.º: 67 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 68 [secuencia de aminoácido deducido]) se preparó recombinantemente conforme a WO 2006/078256 usando BECh2 de *Aspergillus oryzae* como un huésped.

15 [0469] El caldo filtrado fue desalado y cambiado de tampón utilizando un concentrador de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) con 25 mM pH Tris-HCl 8.5.

Material desalado se aplicó a 400 ml de columna Q-SEPHAROSE™ Fast-Flow™ (vertida a mano) (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU), lavada con 400 ml 25 mM Tris pH 8.5, y eluida con un gradiente lineal de 1400 ml 0-600 mM de NaCl en 25 mM Tris pH 8.5 con colección de fracciones de 10 ml .

20 Las dracciones fueron agrupadas basándose en SDS-PAGE, y ajustadas a 1.5 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM de Tris pH 8.0 y aplicado a una columna PHENYL SEPHAROSE™ FAST-FLOW® HIGH-SUB® autovertida de 75 ml, lavada con 75 ml 20 mM pH Tris-HCl 8.0, y eluidaa con un gradiente lineal de (NH₄)₂SO₄ de 1500 ml 1.5-0 M en 20 mM pH Tris-HCl 8 con colección de fracciones de 10 ml .

25 Las fracciones fueron agrupadas basándose en el análisis SDS-PAGE y concentradas utilizando un dispositivo de concentración de células agitado de 300 ml (Millipore, Bedford, MA, USA) equipado con una membrana MWCO de 10 kDa y desalada en 20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl.

Concentración de proteína fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit con albúmina de suero bovino como un estándar de proteína.

30

Ejemplo 10: Preparación de beta-xilosidasa GH3 de RutC30 de *Trichoderma reesei*

[0470] Un gen de beta-xilosidasa de RutC30 de *Trichoderma reesei* (SEC ID n.º: 69 [secuencia de ADN] y SEC ID n.º: 70 [secuencia de aminoácido deducido]) fue aislado por la selección de una Lambda ZAP®-CMR XR Library preparada de ADN genómico de RutC30 de *T. reesei* usando un Lambda ZAP®-CMR XR Library Construction Kit (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

ADN genómico de RutC30 de *T. reesei* se preparó utilizando los métodos estándar.

Un segmento de ADN que codifica 2300 pb de la beta-xilosidasa de *T. reesei* fue amplificado utilizando los cebadores de la PCR mostrados a continuación.

40 Cebador directo:

5'-gtgaataacgcagctcttctcg-3' (SEC ID n.º: 87)

Cebador inverso:

5'-cctaattaattatgctcaggtgt-3' (SEC ID n.º: 88)

45

[0471] Cebador 994768 fue diseñado para amplificar desde la primera base después del sitio de inicio de beta-xilosidasa y el cebador 994769 fue diseñado con un sitio *Pac I* en el extremo 5'.

50 [0472] Cinquenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción por PCR compuesta por 50 ng de ADN plásmido de la biblioteca lamda zap, 1 µl de una mezcla 10 mM de dATP, dTTP dGTP, y dCTP, 5 µl de 10X PLATINUM® Pfx DNA Polymerase Buffer, y 1 unidad de PLATINUM® Pfx ADN Polimerasa, en un volumen final de 50 µl.

Un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 fue usado para amplificar el fragmento de ADN programado para 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos; y 30 ciclos cada uno a 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 60 segundos, y 72°C durante 1 minuto 30 segundos.

55 Después de los 30 ciclos, la reacción fue incubada a 72°C durante 10 minutos y luego enfriada a 4°C hasta otro tratamiento.

60 [0473] Un producto de PCR de 2.3 kb fue purificado por electroforesis en gel de agarosa al 1% usando tampón TAE, cortado del gel, y purificado utilizando un QIAQUICK® Gel Extraction Kit.

El producto de PCR de 2.3 kb fue luego digerido con *Pac I* para facilitar la inserción en pAILo1 (WO 2004/099228).

[0474] El vector pAILo1 fue digerido con *Nco I* y luego rellenado usando T4 ADN polimerasa (Roche Applied Science, Nutley, NJ, EE.UU) según instrucciones del fabricante.

65 Una segunda enzima, *Pac I*, fue luego usada para digerir el extremo 5' de pAILo1 y la reacción fue purificada por electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente para aislar un fragmento de vector de 6.9 kb.

- [0475] El fragmento de beta-xilosidasa de 2.3 kb fue luego ligado al fragmento de vector de 6.9 kb y transformado en células competentes de subclonación de *E. coli* XL1-Blue (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU) según instrucciones del fabricante.
- 5 Transformantes fueron seleccionados usando análisis de digestión de restricción para identificar aquellos con el inserto correcto.
Un nuevo vector de expresión, pSaMe04, fue confirmado por la secuenciación usando un ABI 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) y química de terminadores fluorescentes (Giesecke et al., 1992, supra).
- 10 [0476] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR el gen de beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* de pSaMe04 para construir un vector de expresión de Trichoderma.
Un IN-FUSION™ Cloning Kit fue usado para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pMJ09 (WO 2005/056772), sin la necesidad de digestión por restricción y ligamiento.
- 15 TrBXYL-F (ID 064491):
5'-CGGACTGCGCACCATGGTGAATAACGCAGCTCT-3' (SEC ID n.º: 89)
- TrBXYL-R (ID 064492):
20 5'-TCGCCACGGAGCTTATTATGCGTCAGGTGTAGCAT-3' (SEC ID n.º: 90)
- [0477] Letras en negrita representan la secuencia codificante.
La secuencia restante es homóloga a los sitios de inserción de pMJ09.
- 25 [0478] Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción por PCR compuesta por 50 ng de pSaMe04, 1 µl de una mezcla 10 mM de dATP, dTTP, dGTP, y dCTP, 5 µl de 10XACCUTAQ™ DNA Polymerase Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), y 5 unidades de ACCUTAQ™ DNA polymerase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU), en un volumen final de 50 µl.
Un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 fue usado para amplificar el fragmento de ADN programado para 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos; y 30 ciclos cada uno a 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 60 segundos, y 72°C durante 1 minuto 30 segundos.
- 30 Después de los 30 ciclos, la reacción fue incubada a 72°C durante 10 minutos y luego enfriada a 4°C hasta otro tratamiento.
- 35 [0479] Los productos reactivos fueron aislados por electroforesis en gel de agarosa al 1.0% usando tampón TAE donde una banda de producto de 1.2 kb fue cortada del gel y purificada utilizando un QIAQUICK® Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.
- [0480] El fragmento d 1,2 kb fue luego clonado en pMJ09 utilizando un IN-FUSION™ Cloning Kit.
40 El vector fue digerido con *Pac* I y *Nco* I y purificado por electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente.
El fragmento de gen y el vector digerido fueron ligados juntos en una reacción dando como resultado el plásmido de expresión pSaMe-TrBXYL donde la transcripción del gen de beta-xilosidasa estaba bajo el control del promotor del gen *cbh1* de *T. reesei*.
- 45 La reacción de ligamiento (50 µl) fue compuesta por 1X IN-FUSION™ Buffer, 1X BSA, 1 µl de enzima IN-FUSION™ (diluida 1:10), 100 ng de pMJ09 digerido con *Pac* I y *Nco* I, y 100 ng del producto PCR purificado de beta-xilosidasa de *T. reesei*.
La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Un µl de la reacción fue usado para transformar células competentes de *E. coli* XL10 SOLOPACK® Gold.
- 50 Un transformante de *E. coli* que contiene pSaMe-TrBXYL fue detectado por digestión de enzima de restricción y ADN plásmido fue preparado utilizando un BIOROBOT® 9600.
Secuenciación del ADN del gen de beta-xilosidasa de *T. reesei* de pSaMe-TrBXYL fue realizada utilizando la química de terminadores de coloración (Giesecke et al., 1992, supra) y estrategia de paseos con cebadores.
- 55 [0481] El plásmido PSaMe-AaXYL fue construido para comprender el promotor y terminador del gen de celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* y la secuencia codificante de xilanasa GH10 de *Aspergillus aculeatus*.
- [0482] La clonación de la xilanasa de *A. aculeatus* seguida del protocolo de clonación de expresión total como se indica en H. Dalbøge et al., 1994, Mol. Gen. Genet. 243: 253-260.
- 60 [0483] ARN fue aislado de micelio de *A. aculeatus* CBS 101.43.
Poli(A)+ ARN fue aislado de ARN total por cromatografía en oligo(dT)-celulosa.
ADNc bicatenario fue sintetizado como se describe por Maniatis et al. (Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982).
- 65 Después de la síntesis el ADNc fue tratado con nucleasa de la judía de Mung, con extremos redondeados con T4 DNA polimerasa, y ligado a adaptadores Bst XI no palindrómicos (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

El ADNc fue fraccionado por tamaño por electroforesis en gel de agarosa al 1% usando tampón TAE donde se usaron fragmentos que varían de 600 pb a 4000 pb en la construcción de la biblioteca.

El ADN fue ligado en pYES 2.0 digerido con Bst XI (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU) entre el promotor GAL1 y el terminador iso-1-citocromo c y transformado en células MC1061 de *Escherichia coli* (Stratagene, la Jolla, CA, USA).

La biblioteca fue colocada en placas de LB e incubada durante toda la noche a 37°C.

Las colonias fueron rascadas de las placas y resuspendidas en el medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml.

ADN plásmido fue aislado utilizando un Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

El ADN plásmido purificado fue agrupado.

[0484] La mezcla de ADN plásmido purificado fue transformada en células W3124 de *Saccharomyces cerevisiae* (MATa; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-1137; prcl::HIS3; prbl:: LEU2; cir+; van den Hazel et al., 1992, Eur. J. Biochem. 207: 277-283).

Cultivo, transformación y medios fueron como se describe por Guthrie et al., 1991, Meth. Enzymol. Vol 194, Academic Press.

Las células transformadas fueron colocadas en placas agar completas sintéticas conteniendo glucosa al 2% durante 3 días a 30°C.

Después de 3 días las colonias fueron replicadas en placas de SC agar con galactosa al 2% e incubadas durante 4 días a 30°C.

Colonias de expresión de xilanasas fueron identificadas utilizando una cobertura de agarosa al 1% con 0.1 % AZCL-birch-xilano a pH 4.5 (Dalbøge, 2006, FEMS Microbiology Reviews 21: 29-42).

Las colonias que expresaron actividad de xilanasas fueron rodeadas por una zona azul.

ADN plásmido, salvado de las colonias positivas, contenía un inserto de ADN de aproximadamente 1.3 kb.

La secuenciación del fragmento de gen aislado reveló un marco de lectura abierto de 1218 pb que codificaba un polipéptido con un peso molecular teórico de 43.0 kDa.

El fragmento de ADNc fue subclonado en el vector de expresión pHD464 de *Aspergillus* (Dalbøge y Heldt-Hansen, 1994, Mol. Gen. Genet. 243,253-260) digerido con Bam HI y Xho I digiriendo el clon con Bam HI y Xho I y aislando el inserto de ADNc de 1.2 kb (Christgau et al., 1996, Biochem. J. 319: 705-712) para generar el plásmido pA2X2.

[0485] La secuencia codificante de xilanasas GH10 de *A. aculeatus* fue amplificada por PCR usando el plásmido pA2x2 como modelo y cebadores 153505 y 153506 mostrados a continuación usando métodos estándar para producir un fragmento de aproximadamente 1.2 kb .

El fragmento de 1.2 kb fue digerido con Bam HI y Xho I (introducido en los cebadores de PCR) y clonado en el vector pCaHj527 (WO 2004/099228).

El plásmido resultante fue designado pMT2155 donde el ADNc estaba bajo control transcripcional del promotor de la amilasa neutra II (NA2) de *A. niger* y el terminador AMG de *A. niger*.

Cebador 153505:

5'-TCTTGGATCCACCATGGTCGGACTGCTTTCAATCACC-3' (SEC ID n.º: 91)

Cebador 153506:

5'-TTAACTCGAGTCACAGACACTGCGAGTAATAGTC-3' (SEC ID n.º: 92)

[0486] Dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación fueron diseñados para amplificar por PCR el gen GH10 de *A. aculeatus* del plásmido pMT2155 e introducir regiones flanqueantes para inserción en el vector de expresión pMJ09 (WO 2005/056772).

Letras en negrita representan la secuencia codificante y la secuencia restante es homóloga a los sitios de inserción de pMJ09.

Cebador directo:

5'-cggactgcgcaccat**ggtcggactgctttcaat**-3' (SEC ID n.º: 93)

Cebador inverso:

5'-tcgccaccggagctt**atcacagacactgcgagtaat**-3' (SEC ID n.º: 94)

[0487] Cincuenta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores fueron usados en una reacción por PCR consistente en 50 ng de pMT2155, 1 µl de una mezcla 10 mM de dATP, dTTP, dGTP, y dCTP, 5 µl de 10X ACCUTAQ™ DNA Polymerase Buffer, y 5 unidades de ACCUTAQ™ DNA polimerasa, en un volumen final de 50 µl.

Un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 fue usado para amplificar el fragmento de ADN programado para 1 ciclo a 95°C durante 3 minutos; y 30 ciclos cada uno a 94°C durante 45 segundos, 55°C durante 60 segundos, y 72°C durante 1 minuto 30 segundos.

Después de los 30 ciclos, la reacción fue incubada a 72°C durante 10 minutos y luego enfriada a 4°C hasta otro tratamiento.

[0488] Los productos reactivos fueron aislados por electroforesis en gel de agarosa al 1% usando tampón TAE donde una banda de producto de 1.2 kb fue cortada del gel y purificada utilizando un QIAquick Gel Extraction Kit según las instrucciones del fabricante.

[0489] El fragmento fue luego clonado en pMJ09 utilizando un IN-FUSION™ Cloning Kit.

El vector fue digerido con *Pac* I y *Nco* I y purificado por electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito anteriormente.

5 El fragmento de gen de 1.2 kb y el vector digerido fueron ligados juntos en una reacción dando como resultado el plásmido de expresión pSaMe-AaXYL donde la transcripción del gen de la Familia GH10 estuvo bajo el control del promotor *cbh1* de *T. reesei*.

La reacción de ligamiento (50 ul) fue compuesta por 1X IN-FUSION™ Buffer, 1X BSA, 1 µl de enzima IN-FUSION™ (diluida 1:10), 100 ng de pAILo2 digerido con *Pac* I y *Nco* I, y 100 ng del producto de PCR purificado de xilanasas GH10 de *A. aculeatus*.

10 La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos.
Un µl de la reacción fue usada para transformar células competentes de *E. coli* XL10 SOLOPACK® Gold según el fabricante.

15 Un transformante de *E. coli* que contiene pSaMe-AaGH10 fue detectado por digestión de enzima de restricción y ADN plásmido fue preparado utilizando un BIOROBOT® 9600.

La secuenciación del ADN del gen GH10 de *A. aculeatus* de pSaMe-AaXYL fue realizada utilizando la química de terminadores de coloración (Giesecke et al., 1992, supra) y estrategia de paseos con cebadores.

20 [0490] Los plásmidos PSaMe-AaXYL que codifican la endoglucanasa GH10 de *A. aculeatus* y pSaMe-TrBXYL que codifica la beta-xilosidasa de *T. reesei* fueron cotransformados en RutC30 de *Trichoderma reesei* por transformación mediada por PEG (Penttila et al., 1987, Gene 61 155-164) para generar la cepa SaMe-BXX13 de *T. reesei*.

Cada plásmido contuvo el gen *amdS* de *A. nidulans* para permitir que los transformantes crecieran en acetamida como la única fuente de nitrógeno.

25 [0491] RutC30 de *T. reesei* fue cultivado a 27°C y 90 r.p.m. en 25 ml de medio YP suplementado con glucosa al 2% (p/v) y 10 mM de uridina durante 17 horas.

Micelios fueron recogidos por filtración usando un sistema de filtración desechable impulsado por vacío (Millipore, Bedford, MA, EE.UU) y lavado dos veces con agua desionizada y dos veces con 1.2 M sorbitol.

30 Los protoplastos fueron generados por la suspensión de los micelios lavados en 20 ml de 1.2 M sorbitol conteniendo 15 mg de GLUCANEX™ (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) por ml y 0.36 unidades de quitinasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU) por ml e incubando durante 15-25 minutos a 34°C con agitación suave a 90 r.p.m.

Los protoplastos fueron recogidos por centrifugado durante 7 minutos a 400 x g y lavados dos veces con 1.2 M de sorbitol frío.

35 Los protoplastos fueron contados utilizando un hemocitómetro y resuspendidos en STC hasta una concentración final de 1 X 10⁸ protoplastos por ml.

Los protoplastos en exceso fueron almacenados en un Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene, Rochester, NY, EE.UU) a -80°C.

40 [0492] Aproximadamente 4 µg de plásmidos pSaMe-AaXYL y pSaMe-TrBXYL fueron digeridos con *Pme* I y añadidos a 100 µl de solución de protoplastos y mezclados suavemente, seguido de 250 µl de 10 mM CaCl₂-10 mM pH Tris-HCl 7.5-60% PEG 4000, mezclados, e incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos.

STC (3 ml) fue luego adicionada y mezclada y la solución de transformación fue colocada en placas COVE usando selección de *amdS* de *Aspergillus nidulans*.

45 Las placas fueron incubadas a 28°C durante 5-7 días.
Transformantes fueron sub-cultivados en placas COVE2 y crecidos a 28°C.

[0493] Unos 40 transformantes fueron subcultivados en placas frescas que contenían acetamida y se dejaron esporular durante 7 días a 28°C.

50 [0494] Los transformantes de *Trichoderma reesei* fueron cultivados en frascos de agitación disipados de 125 ml conteniendo 25 ml de medio CIM a pH 6.0 por la inoculación de esporas de los transformantes e incubando a 28°C y 200 r.p.m. durante 7 días.

RutC30 de *Trichoderma reesei* fue ejecutado como un control.

55 Las muestras de caldo de cultivo fueron quitadas el día 5.
Un ml de cada caldo de cultivo fue centrifugado a 15.700 x g durante 5 minutos en una microcentrifugadora y los sobrenadantes transferidos a nuevos tubos.

60 [0495] SDS-PAGE fue realizada usando CRITERION® Tris-HCl (5% redisolviendo) geles con un CRITERION® System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Cinco µl de sobrenadantes del día 7 (ver arriba) fueron suspendidos en 2X concentración de tampón de muestra de Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU) y hervidos en presencia de 5% de beta-mercaptoetanol durante 3 minutos.

65 Las muestras sobrenadantes fueron cargadas en gel de poliacrilamida y sometidas a electroforesis con 1X Tris/Glicina/SDS como tampón de desplazamiento (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).
El gel resultante fue manchado con BIO-SAFE™ Coomassie Stain.

El transformante que muestra la expresión máxima de la xilanasa GH10 de *A. aculeatus* y la beta-xilosidasa de *T. reesei* basada en el gel de proteína fue designado SaMe-BXX13 de *T. reesei*.

5 [0496] SaMe-BXX13 de *Trichoderma reesei* fue cultivado en frascos de agitación de 500 ml disipados conteniendo 250 ml de medio CIM a pH 6.0 inoculado con esporas de SaMe-BXX13 de *T. reesei*. Frascos de agitación fueron incubados a 28°C a 200 r.p.m. durante cinco días. El caldo de cultivo fue luego filtrado utilizando una EXPRESS™ Plus Membrane de 0.22 µm.

10 [0497] El caldo filtrado fue concentrado y el tampón cambiado utilizando un concentrador de flujo tangencial (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Pall Filtron, Northborough, MA, EE.UU) a pH 4.0 con ácido acético.

La muestra fue cargada sobre una columna de SEPHAROSE® SP (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU) equilibrada en 50 mM de acetato sódico pH 4.0, eludiendo las proteínas ligadas con un gradiente de 0-1000 mM de cloruro sódico.

15 Las fracciones fueron intercambiadas del tampón en 20 mM de fosfato sódico pH 7.0 usando un concentrador de flujo tangencial y aplicado a una columna de PHENYL SUPEROSE™ HR 16/10 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, EE.UU) equilibrada con 1.5 M (NH₄)₂SO₄-20 mM de fosfato sódico pH 7.0.

Proteínas ligadas fueron eluidas con un gradiente lineal sobre 20 volúmenes de columna de 1.5 a 0 M (NH₄)₂SO₄ en 20 mM Tris-HCl pH 7.0.

20 Las fracciones de proteína fueron intercambiadas del tampón en 20 mM TEA HCl pH 7.5 usando un concentrador de flujo tangencial.

La muestra fue aplicada a una columna de intercambio iónico MONOQ™ HR 16/10, equilibrada en 20 mM TEA HCl pH 7.5, eludiendo las proteínas ligadas con un gradiente de 0-300 mM cloruro sódico.

Tampón de fracciones de proteína final fue 20 mM TEA-100 mM de cloruro sódico pH 7.5.

25 Concentración de proteínas fue determinada usando un Microplate BCA™ Protein Assay Kit donde albúmina de suero bovino fue usada como un estándar de proteína.

Ejemplo 11: Preparación de celulosa hinchada de ácido fosfórico

30 [0498] Celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC) fue obtenida a partir de AVICEL® PH101, (FMC, Philadelphia, PA, EE.UU) utilizando el protocolo descrito por Zhang et al., 2006, Biomacromolecules 7: 644-648.

Ejemplo 12: Ensayo de hidrólisis de celulosa hinchada con ácido fosfórico (PASC)

35 [0499] Un lodo al 1.0% de PASC preparado como se describe en el ejemplo 11 fue íntegramente resuspendido por agitación, y rápidamente transferido a un vaso de precipitado de 100 ml y agitado rápidamente con un agitador magnético.

Partes alícuotas de quinientos µl del lodo PASC 1.0% fueron pipetados en pocillos de una placa de 96 pocillos de 2.0 ml (Axygen, Union City, CA, EE.UU) utilizando una micropipeta de 1000 µl con una punta de abertura amplia (extremo de corte de punta aproximadamente 2 mm desde la base).

40 Cien µl de 10 mM MnSO₄-500 mM de acetato sódico pH 5 fueron luego añadidos a cada pocillo.

Doscientos µl de bien agua desionizada o una solución de pirogalol al 1,0% (p/p) (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, MO, EE.UU) fueron adicionados a cada pocillo.

45 Mezclas enzimáticas fueron preparadas y luego adicionadas simultáneamente a todos los pocillos en un volumen de 200 µl, para un total de 1 ml en cada reacción.

La placa fue luego sellada utilizando un termosellador de placas de ALPS 300™ (Abgene, Epsom, Reino Unido), mezclada íntegramente, e incubada a bien 50°C o 65°C durante aproximadamente 3 días.

Todos los experimentos proporcionados fueron realizados por triplicado.

50 [0500] Análisis primario de las reacciones de hidrólisis fue realizado utilizando una AGILENT® 1100 HPLC (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU) con software de CHEMSTATION® (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU) equipado con una columna AMINEX™ HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Después de aproximadamente 4 días, la placa de pocillos profundos fue quitada de la incubadora y helada durante toda la noche a 4°C.

55 La placa fue luego bien mezclada por inversión y brevemente centrifugada a 52 x g en un SORVALL® RT7 centrífugo durante 10 segundos.

Las muestras fueron luego mezcladas por pipeteo, y 200 µl de cada pocillo fueron transferidos a un conjunto de placas de filtración centrífuga MULTISCREEN® HV (Millipore, Bedford, MA, EE.UU) .

60 El conjunto de placas de filtración centrífuga fue centrifugada a 2000 r.p.m. en un SORVALL® RT7 centrífugo durante 20 minutos.

Los filtrados fueron transferidos a una placa automuestreadora de 96 pocillos y diluidos 1:1 con 5 mM H₂SO₄, sellados con red de sellado de silicona, e insertados en un módulo de inyector de HPLC (ajustado a 4°C) para inyección de 20 µl sobre una columna de protección CATION H™ conectada a una columna 4,6 x 250 mm AMINEX® HPX-87H seguida de elución con 0.05% p/p ácido benzoico en 5 mM H₂SO₄.

65 Azúcares fueron detectados por detección de índice de refracción con cuantificación por integración en comparación

con estándares de azúcar purificado.

[0501] Todo el procesamiento de datos de HPLC fue realizado usando el software de MICROSOFT EXCEL™ (Microsoft, Richland, WA, USA).

5 Concentraciones de glucosa medidas fueron ajustadas para el factor de dilución apropiado.

En este ensayo solo glucosa fue medida ya que la beta-glucosidasa estaba a altos niveles en todas las muestras menos en los controles.

Porcentaje de conversión relativa fue calculado utilizando la ecuación siguiente:

10
$$\% \text{ conversión} = [\text{concentración de glucosa de la muestra}] / [\text{concentración de glucosa en una digestión límite}] \times 100$$

[0502] Para calcular % conversión, un punto de conversión del 100% fue ajustado basado en un control de celulosa de 100 mg de celulosa de *Trichoderma reesei* por gramo de celulosa (CELLUCLAST PLUS™, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y todos los valores fueron divididos por este número y luego multiplicados por 100.

15 Se hizo un promedio de los puntos de datos triplicados y la desviación estándar fue calculada.

Ejemplo 13: Efecto de la adición de la variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *Aspergillus fumigatus* en la conversión de celulosa hinchada de ácido fosfórico por beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* en presencia de pirogalol a 50°C y 65°C

20

[0503] Polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus* y variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. fumigatus* fueron evaluados para su capacidad para mejorar la hidrólisis de celulosa hinchada con ácido fosfórico por beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* en presencia de pirogalol.

25 El ensayo de hidrólisis de celulosa hinchada con ácido fosfórico fue realizado como se describe en el ejemplo 12.

[0504] La conversión de celulosa hinchada con ácido fosfórico (0.5% p/p) por la combinación de pirogalol (0.2% p/p) y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (5 mg proteína por g celulosa); la combinación de (0.2% p/p) pirogalol, polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus* (10 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (5 mg proteína por g celulosa); y la combinación de pirogalol (0.2% p/p), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (10 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (5 mg de proteína por g celulosa) fue determinada según el ensayo descrito en ejemplo 12.

30 Los datos fueron recogidos y analizados, como se describe en el ejemplo 12, después de 72 horas de incubación a bien 50°C o 65°C.

35 Los resultados se muestran en la figura 2.

[0505] La combinación de pirogalol (0.2% p/p) y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (5 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de celulosa hinchada con ácido fosfórico de $2.1 \pm 0.3\%$ y $2.2 \pm 1.0\%$ a 50°C y 65°C, respectivamente.

40 La adición de polipéptido tipo salvaje GH61 B de *A. fumigatus* (10 mg proteína por g celulosa) a la combinación de pirogalol (0.2% p/p) y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (5 mg de proteína por g celulosa) resultó en la conversión de celulosa hinchada con ácido fosfórico de $23.8 \pm 0.6\%$ y $16.8 \pm 0.4\%$ a 50°C y 65°C, respectivamente.

45 La adición de variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. fumigatus* (10 mg proteína por g celulosa) a la combinación de pirogalol (0.2% p/p) y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (5 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de celulosa hinchada con ácido fosfórico de $46.1 \pm 1.1\%$ y $23.4 \pm 0.7\%$ a 50°C y 65°C, respectivamente.

Ejemplo 14: Ensayo de hidrólisis de rastrojos de maíz pretratados

50 [0506] Rastrojos de maíz fueron pretratados en el U.S. Department of Energy National Renewable Energy Laboratory (NREL) utilizando 1.4 % en peso de ácido sulfúrico a 165°C y 107 psi durante 8 minutos.

Los sólidos insolubles en agua en los rastrojos de maíz pretratados (PCS) contenían aproximadamente 59% celulosa, 5% hemicelulosa y 28% lignina.

55 Celulosa y hemicelulosa fueron determinadas por una hidrólisis de ácido sulfúrico de dos etapas con análisis posterior de azúcares por cromatografía líquida de alto rendimiento usando procedimiento analítico estándar NREL #002.

Lignina fue determinada gravimétricamente después de hidrolizar la celulosa y fracciones de hemicelulosa con ácido sulfúrico usando procedimiento analítico estándar NREL #003.

60 [0507] La hidrólisis de PCS fue conducida utilizando placas de pocillos profundos de 2,2 ml (Axygen, Union City, CA, EE.UU) en un volumen de reacción total de 1,0 ml.

La hidrólisis fue realizada con 50 mg de PCS por ml de 50 mM tampón de acetato sódico pH 5.0 conteniendo 1 mM de sulfato de manganeso y varias cargas de proteína de la composición de celulosa (expresada como mg proteína por gramo de celulosa).

65

Mezclas enzimáticas fueron preparadas y luego adicionadas simultáneamente a todos los pocillos en un volumen de 100 µl, para un volumen final de 1 ml en cada reacción.

La placa fue luego sellada utilizando un termosellador de placas ALPS-300™, mezclada íntegramente, e incubado a 50°C, 55°C, 60°C, y/o 65°C durante 72 horas.

5 Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

[0508] Después de la hidrólisis, las muestras fueron filtradas utilizando una placa de filtración de 96 pocillos de 0.45 µm MULTISCREEN® (Millipore, Bedford, MA EE.UU) y los filtrados fueron analizados para el contenido de azúcar como se describe abajo.

10 Cuando no se usaron inmediatamente, las partes alícuotas azucaradas filtradas fueron congeladas a -20°C.

Las concentraciones de azúcar de las muestras diluidas en 0.005 M H₂SO₄ fueron medidas utilizando una columna 4.6 x 250 mm AMINEX® HPX-87H por elución con 0.05% p/p de ácido benzoico-0.005 M H₂SO₄ a una velocidad de flujo de 0.6 ml por minuto a 65°C, y lacuantificación por integración de glucosa y señal de celobiosa de detección de índice de refracción (CHEMSTATION®, AGILENT® 1100 HPLC, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU) calibrada por muestras de azúcar puro.

15 Los equivalentes resultantes fueron usados para calcular el porcentaje de conversión de celulosa para cada reacción.

[0509] Todo el procesamiento de datos de HPLC fue realizado usando el software de MICROSOFT EXCEL™.

20 Concentraciones de azúcar medidas fueron ajustadas para el factor de dilución apropiado.

Glucosa y celobiosa fueron medidas individualmente.

Sin embargo, para calcular la conversión total los valores de glucosa y celobiosa fueron combinados.

La concentración de celobiosa fue multiplicada por 1.053 para convertir equivalentes de glucosa y se añadió a la concentración de glucosa.

25 El grado de conversión de celulosa fue calculado utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ conversión} = [\text{concentración de glucosa de la muestra}] / [\text{concentración de glucosa en una digestión límite}] \times 100$$

30 [0510] Para calcular % de conversión, un punto de conversión del 100% fue ajustado basándose en un control de celulosa de 100 mg de la composición de celulosa por gramo de celulosa (CELLUCLAST PLUS™, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y todos los valores fueron divididos por este número y luego multiplicados por 100. Se hizo un promedio de los puntos de datos triplicados y la desviación estándar fue calculada.

35 **Ejemplo 15: Efecto de la adición de variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *Aspergillus fumigatus* en la conversión de PCS por una composición de celulosa de *Trichoderma reesei* y beta-glucosidasa CEL3A de *Aspergillus fumigatus* a 50°C y 55°C**

40 [0511] Una composición de celulosa de la cepa 981-O-8 (D4) de *Trichoderma reesei* fue preparada según el protocolo de fermentación descrito abajo.

La cepa 981-O-8 (D4) de *T. reesei* es una cepa mutagenizada de RutC30 de *Trichoderma reesei* (ATCC 56765; Montenecourt and Eveleigh, 1979, Adv. Chem. Ser. 181: 289-301).

La composición de celulosa es similar a CELLUCLAST (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).

La composición de celulosa fue suplementada con beta-glucosidasa de *A. fumigatus*.

45 La composición de celulosa suplementada con beta-glucosidasa de *A. fumigatus* se designa en los ejemplos como "composición de celulosa de *Trichoderma reesei*".

50 [0512] Medio de matraz de agitación fue compuesto por 20 g de dextrosa, 10 g de sólidos de maíz remojados, 1.45 g de (NH₄)₂SO₄, 2.08 g de KH₂PO₄, 0.36 g de CaCl₂, 0.42 g de MgSO₄·7H₂O, 0.42 ml de solución de metales traza, y agua desionizada hasta 1 litro.

Solución de metales traza fue compuesta por 216 g de FeCl₃·6H₂O, 58 g de ZnSO₄·7H₂O, 27 g de MnSO₄·H₂O, 10 g de CuSO₄·5H₂O, 2.4 g de H₃BO₃, 336 g de ácido cítrico, y agua desionizada hasta 1 litro.

[0513] Cien ml de medio de matraz de agitación se añadió a un matraz de agitación de 500 ml.

55 El matraz de agitación fue inoculado con dos tapones de un cultivo de placa sólida e incubado a 28°C en una coctelera orbital a 200 r.p.m. durante 48 horas.

Cinquenta ml del caldo de matraz de agitación fue usado para inocular un vaso de fermentación de 2 litros.

60 [0514] El medio de lote de fermentación fue compuesto por 30 g de celulosa, 4 g de dextrosa, 10 g de sólidos de maíz remojados, 3.8 g de (NH₄)₂SO₄, 2.8 g de KH₂PO₄, 2.64 g de CaCl₂, 1.63 g de MgSO₄·7H₂O, 1.8 ml de anti espuma, 0.66 ml de solución de metales traza, y agua desionizada hasta 1 litro.

Solución de metales traza fue compuesta por 216 g de FeCl₃·6H₂O, 58 g de ZnSO₄·7H₂O, 27 g de MnSO₄·H₂O, 10 g de CuSO₄·5H₂O, 2.4 g de H₃BO₃, 336 g de ácido cítrico·H₂O, y agua desionizada hasta 1 litro.

El medio de suministro de fermentación fue compuesto por dextrosa.

65

- [0515] Un total de 1.8 litros del medio de lote de fermentación se añadió a un fermentador cubierto de vidrio de Applikon Biotechnology de tres litros.
El medio de suministro de fermentación fue dosificado a razón de 0 a 4 g/l/hr durante un periodo de 185 horas.
El vaso de fermentación fue mantenido a una temperatura de 28°C y el pH fue controlado utilizando un sistema de control de Applikon 1030 hasta un punto de ajuste de 4.5 +/- 0.1.
5 Aire se añadió al vaso a razón de 1 w/m y el caldo fue agitado por impulsor Rushton girando a 1100 a 1300 r.p.m.
Al final de la fermentación, todo el caldo fue cosechado del vaso y centrifugado a 3000 x g para eliminar la biomasa.
El sobrenadante fue sometido a filtración estéril y almacenado a 5 a 10°C.
- 10 [0516] Polipéptido de tipo salvaje GH61 B de *A. fumigatus* y variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61 B de *A. fumigatus* fueron evaluados por su capacidad para mejorar la hidrólisis de PCS por la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* a bien 50°C o 55°C.
El ensayo de hidrólisis PCS fue realizado como se describe en el ejemplo 14.
- 15 [0517] La conversión de PCS por la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg de proteína por gramo de celulosa) y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg de proteína por gramo de celulosa), polipéptido tipo salvaje GH61 B de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg de proteína por gramo de celulosa), polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus* (0.45 mg de proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg de proteína por g de celulosa); la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg de proteína por gramo de celulosa), polipéptido tipo salvaje GH61 B de *A. fumigatus* (0.6 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), polipéptido GH61 B tipo salvaje de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (0.6 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa); y la combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa) fue ensayada como se describe en el ejemplo 14.
Los datos fueron recogidos y analizados, como se describe en el ejemplo 14, después de 72 horas de incubación a bien 50°C o 55°C.
Resultados para 50°C y 55°C se muestran en las Figuras 3A y 3B, respectivamente.
- 40 [0518] La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa) y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de 53.5 ± 0.2% y 52.2 ± 0.3% a 50°C y 55°C, respectivamente.
- 45 [0519] La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), polipéptido tipo salvaje GH61 B de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de 62.6 ± 0.1% y 61.5 ± 0.4% a 50°C y 55°C, respectivamente.
La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus* (0.45 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg de proteína por g de celulosa) resultó en la conversión de PCS de 64.3 ± 0.1% y 63.4 ± 0.1% a 50°C y 55°C, respectivamente.
- 50 [0520] La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), polipéptido tipo salvaje GH61 B de *A. fumigatus* (0.6 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg de proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de 65.0 ± 0.5% y 64.5 ± 0.6% a 50°C y 55°C, respectivamente.
La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg de proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de 66.4 ± 0.2% y 66.1 ± 0.4% a 50°C y 55°C, respectivamente.
- 60 [0521] La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg de proteína por gramo de celulosa), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de 63.9 ± 0.2% y 62.4 ± 0.7% a 50°C y 55°C, respectivamente.
- 65

La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (0.45 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de $65.2 \pm 0.3\%$ y $64.9 \pm 0.4\%$ a 50°C y 55°C, respectivamente.

5 La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (0.6 mg proteína por g celulosa), y CEL3A beta-glucosidasa de *A. fumigatus* (0.3 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de $65.7 \pm 0.6\%$ y $65.7 \pm 0.4\%$ a 50°C y 55°C, respectivamente.

10 La combinación de la composición de celulasa de *T. reesei* (2.7 mg proteína por gramo de celulosa), variante GH61B L90V + D131S + M134L + A141W de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa), y beta-glucosidasa CEL3A de *A. fumigatus* (0.3 mg de proteína por g celulosa) resultó en la conversión de PCS de $67.4 \pm 0.1\%$ y $67.7 \pm 0.4\%$ a 50°C y 55°C, respectivamente.

15 **Ejemplo 16: Efecto de la adición de la variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *Aspergillus fumigatus* en la conversión de PCS por una composición de celulasa de alta temperatura a 50°C, 55°C, 60°C, y 65°C**

[0522] Una mezcla de enzimas de celulasa, designada "composición de celulasa de alta temperatura", se preparó mediante la mezcla de componentes enzimáticos preparados en las siguientes proporciones (de proteína total):
20 43.5% celobiohidrolasa I de *Aspergillus fumigatus*, 29.4% celobiohidrolasa II de *Aspergillus fumigatus*, 5.9% beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus*, 5.9% xilanasas 3 GH10 de *Aspergillus fumigatus*, 3.5% beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y 11.8% endoglucanasa II CEL5A de *Trichoderma reesei*.

25 La composición cuando se carga en el ensayo a 3 mg de proteína total por gramo de celulosa tuvo las siguientes cargas enzimáticas por gramo de celulosa: 1.31 mg de celobiohidrolasa I de *A. fumigatus* por gramo de celulosa, 0.88 mg de celobiohidrolasa II de *A. fumigatus* por gramo de celulosa, 0.18 mg de beta-glucosidasa de *A. fumigatus* por gramo de celulosa, 0.18 mg xilanasas 3 GH10 por gramo de celulosa, 0.11 mg beta-xilosidasa de *T. reesei* por gramo de celulosa, y 0.35 mg endoglucanasa II CEL5A de *T. reesei* por gramo de celulosa.

30 [0523] Polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus* y variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. fumigatus* fueron evaluados para su capacidad para mejorar la hidrólisis de PCS por la composición de celulasa a alta temperatura a 50°C, 55°C, 60°C, o 65°C.

El ensayo de hidrólisis de rastrojos de maíz pretratados fue realizado como se describe en el ejemplo 14.

35 [0524] La conversión de rastrojos de maíz pretratados por la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y polipéptido de tipo salvaje GH61B de *A. fumigatus* (0.45 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y polipéptido tipo salvaje GH61 B de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa); la combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y variante L90V + D131 S + M134L + A141W de GH61 B de *A. fumigatus* (0.45 mg proteína por g celulosa); y la combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61 B de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa) fue ensayada como se describe en el ejemplo 14.

40 Los datos fueron recogidos y analizados, como se describe en el ejemplo 14, después de 72 horas de incubación a 50°C, 55°C, 60°C, o 65°C.

45 Los resultados para 0.45 mg de adición del polipéptido GH61 por gramo de celulosa y 0.75 mg de adición del polipéptido GH61 por gramo de celulosa se muestran en las Figuras 4A y 4B, respectivamente.

[0525] La composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de rastrojos de maíz pretratados de $48.5 \pm 0.3\%$, $52.0 \pm 0.1\%$, $43.7 \pm 0.2\%$, y $36.4 \pm 0.1\%$ a 50°C, 55°C, 60°C, o 65°C, respectivamente.

55 [0526] La combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y polipéptido GH61B de tipo salvaje de *A. fumigatus* (0.45 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de rastrojos de maíz pretratados de $60.4 \pm 0.2\%$, $65.8 \pm 0.1\%$, $55.8 \pm 0.1\%$, y $45.2 \pm 0.2\%$ a 50°C, 55°C, 60°C, o 65°C, respectivamente.

La combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y polipéptido GH61B de tipo salvaje de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de rastrojos de maíz pretratados de $61.9 \pm 0.1\%$, $67.6 \pm 0.2\%$, $57.8 \pm 0.3\%$, y $45.5 \pm 0.7\%$ a 50°C, 55°C, 60°C, o 65°C, respectivamente.

60 [0527] La combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. fumigatus* (0.45 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de rastrojos de maíz pretratados de $61.7 \pm 1.1\%$, $66.7 \pm 0.1\%$, $57.9 \pm 0.2\%$, y $45.4 \pm 2.1\%$ a 50°C, 55°C, 60°C, o 65°C, respectivamente.

65 La combinación de la composición de celulasa de alta temperatura (3 mg proteína por g celulosa) y variante L90V + D131S + M134L + A141W de GH61B de *A. fumigatus* (0.75 mg proteína por g celulosa) resultó en la conversión de

ES 2 594 528 T3

rastrojos de maíz pretratados de $62.7 \pm 0.3\%$, $68.5 \pm 0.5\%$, $60.4 \pm 0.8\%$, y $48.6 \pm 0.8\%$ a 50°C , 55°C , 60°C , o 65°C , respectivamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Novozymes, Inc.
Sweeney, Matt
Wogulis, Mark

10 <120> Variantes de polipéptidos que tienen actividad de mejora
celulolítica y polinucleótidos que los codifican

<130> 12033-WO-PCT

15 <140> PCT/US11/054034
<141> 2011-09-29

<150> US 61/388,530
<151> 2010-09-30

20 <160> 94

<170> PatentIn version 3.5

25 <210> 1
<211> 862
<212> ADN
<213> *Aspergillus fumigatus*

30 <400> 1
atgactttgt ccaagatcac ttccattgct ggccttctgg cctcagcgtc tctcgtggct 60
ggccacggct ttgtttctgg cattgttgct gatgggaaat agtatgtgct tgaaccacac 120
35 aaatgacagc tgcaacagct aacttctatt ccagttacgg aggttacctt gttaaccaat 180
accctacat gagcaaccct cccgacacca ttgcctggtc caccaccgcc accgacctcg 240
gctttgtgga cggcaccggc taccagtctc cggatattat ctgccacaga gacgcaaaga 300
40 atggcaagtt gaccgcaacc gttgcagccg gttcacagat cgaattccag tggacgacgt 360
ggccagagtc tcacatgga ccggtacgac gccgaagaga agagaacata ttgtgaccag 420
45 ataggctaac atagcatagt tgattactta cctcgtctcca tgcaacggcg actgtgccac 480
cgtggacaag accaccctga agtttgtcaa gatcgccgct caaggcttga tcgacggctc 540
caaccacct ggtgtttggg ctgatgatga aatgatgcc aacaacaaca cggccacagt 600
50 gaccattcct gcctcctatg cccccgaaa ctacgtcctt cgccacgaga tcatcgccct 660
tactctgcg ggtaacctga acggcgcgca gaactacccc cagtgtttca acatccaaat 720
55 caccggtggc ggcagtgtc agggatctgg caccgctggc acgtccctgt acaagaatac 780
tgatcctggc atcaagtttg acatctactc ggatctgagc ggtggatacc ctattcctgg 840
tcctgcactg ttcaacgctt aa 862

ES 2 594 528 T3

```

<210> 2
<211> 250
5 <212> PRT
   <213> Aspergillus fumigatus

<220>
10 <221> SEÑAL
   <222> (1)..(21)

<220>
15 <221> mat_peptide
   <222> (22)..(250)

<400> 2

Met Thr Leu Ser Lys Ile Thr Ser Ile Ala Gly Leu Leu Ala Ser Ala
20      -20                      -15                      -10

Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Ser Gly Ile Val Ala Asp Gly
25      -5          -1 1          5          10

Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser Asn
30          15          20          25

Pro Pro Asp Thr Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly Phe
35          30          35          40

Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Ser Pro Asp Ile Ile Cys His Arg Asp
40          45          50          55

Ala Lys Asn Gly Lys Leu Thr Ala Thr Val Ala Ala Gly Ser Gln Ile
45          60          65          70          75

Glu Phe Gln Trp Thr Thr Trp Pro Glu Ser His His Gly Pro Leu Ile
50          80          85          90

Thr Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ala Thr Val Asp Lys Thr
55          95          100          105

Thr Leu Lys Phe Val Lys Ile Ala Ala Gln Gly Leu Ile Asp Gly Ser
60          110          115          120

Asn Pro Pro Gly Val Trp Ala Asp Asp Glu Met Ile Ala Asn Asn Asn
65          125          130          135

Thr Ala Thr Val Thr Ile Pro Ala Ser Tyr Ala Pro Gly Asn Tyr Val

```

ES 2 594 528 T3

	140				145					150					155	
5	Leu	Arg	His	Glu	Ile	Ile	Ala	Leu	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Leu	Asn	Gly
					160					165					170	
10	Ala	Gln	Asn	Tyr	Pro	Gln	Cys	Phe	Asn	Ile	Gln	Ile	Thr	Gly	Gly	Gly
				175					180					185		
15	Ser	Ala	Gln	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr	Ser	Leu	Tyr	Lys	Asn	Thr
			190					195					200			
20	Asp	Pro	Gly	Ile	Lys	Phe	Asp	Ile	Tyr	Ser	Asp	Leu	Ser	Gly	Gly	Tyr
		205					210					215				
25	Pro	Ile	Pro	Gly	Pro	Ala	Leu	Phe	Asn	Ala						
	220					225										
30	<210>	3														
35	<211>	1377														
	<212>	ADN														
	<213>	Trichoderma reesei														
40	<400>	3														
45	atggcgccct	cagttacact	gccggtgacc	acggccatcc	tggccattgc	ccggctcgtc										60
50	gccgcccagc	aaccgggtac	cagcaccccc	gaggtccatc	ccaagttgac	aacctacaag										120
55	tgtacaaagt	ccggggggtg	cgtggcccag	gacacctcgg	tggtccttga	ctggaactac										180
60	cgctggatgc	acgacgcaaa	ctacaactcg	tgcaccgtca	acggcggcgt	caacaccacg										240
65	ctctgccctg	acgaggcgac	ctgtggcaag	aactgcttca	tcgagggcgt	cgactacgcc										300
70	gcctcgggcg	tcacgacctc	gggcagcagc	ctcaccatga	accagtacat	gcccagcagc										360
75	tctggcggct	acagcagcgt	ctctcctcgg	ctgtatctcc	tggactctga	cggtgagtac										420
80	gtgatgctga	agctcaacgg	ccaggagctg	agcttcgacg	tcgacctctc	tgctctgccg										480
85	tgtggagaga	acggctcgtc	ctacctgtct	cagatggacg	agaacggggg	cgccaaccag										540
90	tataacacgg	ccggtgccaa	ctacgggagc	ggctactgcg	atgctcagtg	ccccgtccag										600
95	acatggagga	acggcaccct	caacactagc	caccagggct	tctgctgcaa	cgagatggat										660
100	atcctggagg	gcaactcgag	ggcgaatgcc	ttgaccctc	actcttgcac	ggccacggcc										720
105	tgcgactctg	ccggttgccg	cttcaacccc	tatggcagcg	gctacaaaag	ctactacggc										780
110	cccggagata	ccggtgacac	ctccaagacc	ttcaccatca	tcaccagtt	caacacggac										840
115	aacggctcgc	cctcgggcaa	ccttgtgagc	atcaccgcga	agtaccagca	aaacggcgtc										900

ES 2 594 528 T3

gacatcccca gcgcccagcc cggcggcgac accatctcgt cctgcccgtc cgcctcagcc 960
 tacggcggcc tcgccaccat gggcaaggcc ctgagcagcg gcatggtgct cgtgttcage 1020
 5 atttgaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca gcggcaacgc cggcccctgc 1080
 agcagcaccg agggcaaccc atccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc 1140
 ttctccaaca tccgctgggg agacattggg tctactacga actcgactgc gccccgccc 1200
 10 ccgcctgcgt ccagcacgac gttttcgact acacggagga gctcgacgac ttcgagcagc 1260
 ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgcggtggca ttgggtacag cgggtgcaag 1320
 15 acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgca atgcctt 1377

<210> 4
 <211> 459
 20 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*
 <400> 4

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Thr Asn Ser Thr Ala Pro Pro Pro
 385 390 395 400
 5
 Pro Pro Ala Ser Ser Thr Thr Phe Ser Thr Thr Arg Arg Ser Ser Thr
 405 410 415
 10
 Thr Ser Ser Ser Pro Ser Cys Thr Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly
 420 425 430
 15
 Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Cys Lys Thr Cys Thr Ser Gly Thr Thr Cys
 435 440 445
 20
 Gln Tyr Ser Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
 450 455

<210> 5
 <211> 1254
 25 <212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 5
 30 atgaacaagt ccgtggctcc attgctgctt gcagcgtcca tactatatgg cggcgccgctc 60
 gcacagcaga ctgtctgggg ccagtgtgga ggtattgggt ggagcggacc tacgaattgt 120
 gctcctggct cagcttgctt gaccctcaat cttattatg cgcaatgtat tccgggagcc 180
 35 actactatca ccaactcgac ccggccacca tccgggtccaa ccaccaccac cagggtacc 240
 tcaacaagct catcaactcc acccagcagc tctgggggtcc gatttgccgg cgttaacatc 300
 gcggggttttg actttggctg taccacagat ggcacttgcg ttacctcgaa ggtttatcct 360
 40 ccggtgaaga acttcaccgg ctcaaacaac taccocgatg gcatcggcca gatgcagcac 420
 ttcgtcaacg aggacgggat gactattttc cgcttacctg tcggatggca gtacctcgtc 480
 45 aacaacaatt tgggcgga tcttgattcc acgagcattt ccaagtatga tcagcttggt 540
 caggggtgcc tgtctctggg cgcatactgc atcgtogaca tccacaatta tgctcgatgg 600
 aacgggtgga tcattgggtca gggcggccct actaatgctc aattcacgag cctttggctc 660
 50 cagttggcat caaagtacgc atctcagtcg aggggtgtgt tcggcatcat gaatgagccc 720
 cacgacgtga acatcaacac ctgggctgcc acgggtccaag aggttgtaac cgcaatccgc 780
 55 aacgctggtg ctacgctgca attcatctct ttgcctggaa atgattggca atctgctggg 840
 gctttcatat ccgatggcag tgcagccgcc ctgtctcaag tcacgaacct ggatgggtca 900
 acaacgaatc tgatTTTTga cgtgcacaaa tacttggtact cagacaactc cgggtactcac 960

ES 2 594 528 T3

gccgaatgta ctacaaataa cattgacggc gccttttctc cgcttgccac ttggctccga 1020
 5 cagaacaatc gccaggctat cctgacagaa accggtggtg gcaacgttca gtcctgcata 1080
 caagacatgt gccagcaaat ccaatatctc aaccagaact cagatgtcta tcttggctat 1140
 gttggttggg gtgccggatc atttgatagc acgtatgtcc tgacggaaac accgactagc 1200
 10 agtggttaact catggacgga cacatccttg gtcagctcgt gtctcgcaag aaag 1254

<210> 6
 <211> 418
 15 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei
 <400> 6

20 Met Asn Lys Ser Val Ala Pro Leu Leu Leu Ala Ala Ser Ile Leu Tyr
 1 5 10 15

25 Gly Gly Ala Val Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile
 20 25 30

30 Gly Trp Ser Gly Pro Thr Asn Cys Ala Pro Gly Ser Ala Cys Ser Thr
 35 40 45

35 Leu Asn Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Thr Ile Thr
 50 55 60

Thr Ser Thr Arg Pro Pro Ser Gly Pro Thr Thr Thr Thr Arg Ala Thr
 65 70 75 80

40 Ser Thr Ser Ser Ser Thr Pro Pro Thr Ser Ser Gly Val Arg Phe Ala
 85 90 95

45 Gly Val Asn Ile Ala Gly Phe Asp Phe Gly Cys Thr Thr Asp Gly Thr
 100 105 110

50 Cys Val Thr Ser Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Asn Phe Thr Gly Ser
 115 120 125

Asn Asn Tyr Pro Asp Gly Ile Gly Gln Met Gln His Phe Val Asn Glu
 130 135 140

55 Asp Gly Met Thr Ile Phe Arg Leu Pro Val Gly Trp Gln Tyr Leu Val
 145 150 155 160

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Ser Gly Asn Ser Trp Thr Asp Thr Ser Leu Val Ser Ser Cys Leu Ala
 405 410 415

5 Arg Lys

10 <210> 7
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Trichoderma reesei

15 <400> 7
 atgaagttcc ttcaagtcct ccctgccctc ataccggccg ccctggccca aaccagctgt 60
 gaccagtggg caaccttcac tggcaacggc tacacagtca gcaacaacct ttggggagca 120
 20 tcagccggct ctggatttgg ctgctgacg gcggtatcgc tcagcggcgg ggccctcctgg 180
 cacgcagact ggcagtggtc cggcggccag aacaacgtca agtcgtacca gaactctcag 240
 attgccattc cccagaagag gaccgtcaac agcatcagca gcatgcccac cactgccagc 300
 25 tggagctaca gcgggagcaa catccgcgct aatgttgcgt atgacttggt caccgcagcc 360
 aaccgaatc atgtcacgta ctcgggagac tacgaactca tgatctggct tggcaaatac 420
 30 ggcgatattg ggccgattgg gtcctcacag ggaacagtca acgtcgggtg ccagagctgg 480
 acgctctact atggctacaa cggagccatg caagtctatt cttttgtggc ccagaccaac 540
 actaccaact acagcggaga tgtcaagaac ttcttcaatt atctccgaga caataaagga 600
 35 tacaacgctg caggccaata tgttcttagc taccaatttg gtaccgagcc cttcacgggc 660
 agtggaaactc tgaacgtcgc atcctggacc gcatctatca ac 702

40 <210> 8
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

45 <400> 8

Met Lys Phe Leu Gln Val Leu Pro Ala Leu Ile Pro Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

50 Gln Thr Ser Cys Asp Gln Trp Ala Thr Phe Thr Gly Asn Gly Tyr Thr
 20 25 30

55 Val Ser Asn Asn Leu Trp Gly Ala Ser Ala Gly Ser Gly Phe Gly Cys
 35 40 45

ES 2 594 528 T3

	Val	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Trp	His	Ala	Asp	Trp	
	50						55					60					
5	Gln	Trp	Ser	Gly	Gly	Gln	Asn	Asn	Val	Lys	Ser	Tyr	Gln	Asn	Ser	Gln	
	65					70					75					80	
10	Ile	Ala	Ile	Pro	Gln	Lys	Arg	Thr	Val	Asn	Ser	Ile	Ser	Ser	Met	Pro	
					85					90					95		
15	Thr	Thr	Ala	Ser	Trp	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Asn	Ile	Arg	Ala	Asn	Val	
				100					105						110		
20	Ala	Tyr	Asp	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Asn	Pro	Asn	His	Val	Thr	Tyr	Ser	
			115					120					125				
25	Gly	Asp	Tyr	Glu	Leu	Met	Ile	Trp	Leu	Gly	Lys	Tyr	Gly	Asp	Ile	Gly	
		130					135					140					
30	Pro	Ile	Gly	Ser	Ser	Gln	Gly	Thr	Val	Asn	Val	Gly	Gly	Gln	Ser	Trp	
	145					150					155					160	
35	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Asn	Gly	Ala	Met	Gln	Val	Tyr	Ser	Phe	Val	
					165					170					175		
40	Ala	Gln	Thr	Asn	Thr	Thr	Asn	Tyr	Ser	Gly	Asp	Val	Lys	Asn	Phe	Phe	
				180					185					190			
45	Asn	Tyr	Leu	Arg	Asp	Asn	Lys	Gly	Tyr	Asn	Ala	Ala	Gly	Gln	Tyr	Val	
			195					200					205				
50	Leu	Ser	Tyr	Gln	Phe	Gly	Thr	Glu	Pro	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	
		210					215					220					
55	Asn	Val	Ala	Ser	Trp	Thr	Ala	Ser	Ile	Asn							
	225					230											
	<210>	9															
	<211>	726															
	<212>	ADN															
	<213>	Trichoderma reesei															
	<400>	9															
	atgaaggcaa	ctctggttct	cggctccctc	attgtaggcg	ccgtttccgc	gtacaaggcc										60	
	accaccacgc	gctactacga	tgggcaggag	ggtgcttgcg	gatgcggctc	gagctccggc										120	
	gcattcccgt	ggcagctcgg	catcggcaac	ggagtctaca	cggctgccgg	ctcccaggct										180	

ES 2 594 528 T3

ctcttcgaca cggccggagc ttcattggtgc ggcgcccggct gcggtaaatag ctaccagctc 240
 5 acctcgacgg gccagggcgcc ctgctccagc tgcggcacgg gcggtgctgc tggccagagc 300
 atcatcgtca tgggtgaccaa cctgtgccccg aacaatggga acgcgcagtg gtgccccggtg 360
 gtcggcggca ccaaccaata cggctacagc taccatttcg acatcatggc gcagaacgag 420
 10 atctttggag acaatgtcgt cgtcgcacttt gagcccattg cttgccccgg gcaggctgcc 480
 tctgactggg ggacgtgcct ctgctggga cagcaagaga cggatcccac gcccgctcctc 540
 ggcaacgaca cgggctcaac tcctcccggg agctcgcgc cagcgacatc gtcgagtccg 600
 15 ccgtctggcg gcggccagca gacgctctat ggccagtgtg gaggtgccgg ctggacggga 660
 cctacgacgt gccaggcccc agggacctgc aaggttcaga accagtggta ctcccagtgt 720
 20 cttcct 726

<210> 10
 <211> 242
 25 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*
 <400> 10

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

ES 2 594 528 T3

Tyr Ser Tyr His Phe Asp Ile Met Ala Gln Asn Glu Ile Phe Gly Asp
 130 135 140
 5
 Asn Val Val Val Asp Phe Glu Pro Ile Ala Cys Pro Gly Gln Ala Ala
 145 150 155 160
 10
 Ser Asp Trp Gly Thr Cys Leu Cys Val Gly Gln Gln Glu Thr Asp Pro
 165 170 175
 15
 Thr Pro Val Leu Gly Asn Asp Thr Gly Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser
 180 185 190
 20
 Pro Pro Ala Thr Ser Ser Ser Pro Pro Ser Gly Gly Gly Gln Gln Thr
 195 200 205
 25
 Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ala Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys
 210 215 220
 30
 Gln Ala Pro Gly Thr Cys Lys Val Gln Asn Gln Trp Tyr Ser Gln Cys
 225 230 235 240
 35
 Leu Pro
 40
 <210> 11
 <211> 923
 <212> ADN
 <213> Humicola insolens
 45
 <400> 11
 atgcgttcct cccccctcct ccgctccgcc gttgtggccg ccctgccggt gttggccctt 60
 gccgctgatg gcaggtccac ccgctactgg gactgctgca agccttcgtg cggctgggcc 120
 aagaaggctc ccgtgaacca gcctgtcttt tcctgcaacg ccaacttcca gcgtatcacg 180
 gacttcgacg ccaagtccgg ctgcgagccg ggcggtgtcg cctactcgtg cgccgaccag 240
 accccatggg ctgtgaacga cgacttcgcg ctcggttttg ctgccacctc tattgccggc 300
 50
 agcaatgagg cgggctggtg ctgcgctgc tacgagctca cttcacatc cggtcctggt 360
 gctggcaaga agatggtcgt ccagtccacc agcactggcg gtgatcttgg cagcaaccac 420
 55
 ttcgatctca acatccccgg cggcggcgtc ggcactctcg acggatgcac tccccagttc 480
 ggcggtctgc ccggccagcg ctacggcggc atctcgtccc gcaacgagtg cgatcggttc 540
 cccgacgccc tcaagcccgg ctgctactgg cgcttcgact ggttcaagaa cgccgacaat 600

ES 2 594 528 T3

ccgagcttca gcttccgtca ggtccagtgc ccagccgagc tcgtcgctcg caccggatgc 660
 cgccgcaacg acgacggcaa cttccctgcc gtccagatcc cctccagcag caccagctct 720
 5 ccggtcaacc agcctaccag caccagcacc acgtccacct ccaccacctc gagcccgcca 780
 gtccagccta cgactcccag cggctgcact gctgagaggt gggctcagtg cggcggcaat 840
 10 ggctggagcg gctgcaccac ctgcgtcgct ggcagcactt gcacgaagat taatgactgg 900
 taccatcagt gcctgtagaa ttc 923

15 <210> 12
 <211> 305
 <212> PRT
 <213> Humicola insolens

20 <400> 12

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
 1 5 10 15

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

30 Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
 35 40 45

35 Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
 50 55 60

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
 65 70 75 80

40 Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
 85 90 95

45 Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
 100 105 110

50 Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 115 120 125

55 Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
 130 135 140

Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
 145 150 155 160

ES 2 594 528 T3

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
 165 170 175
 5
 Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
 180 185 190
 10
 Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Ser Phe Ser Phe Arg Gln Val
 195 200 205
 15
 Gln Cys Pro Ala Glu Leu Val Ala Arg Thr Gly Cys Arg Arg Asn Asp
 210 215 220
 20
 Asp Gly Asn Phe Pro Ala Val Gln Ile Pro Ser Ser Ser Thr Ser Ser
 225 230 235 240
 25
 Pro Val Asn Gln Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Thr
 245 250 255
 30
 Ser Ser Pro Pro Val Gln Pro Thr Thr Pro Ser Gly Cys Thr Ala Glu
 260 265 270
 35
 Arg Trp Ala Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Ser Gly Cys Thr Thr Cys
 275 280 285
 40
 Val Ala Gly Ser Thr Cys Thr Lys Ile Asn Asp Trp Tyr His Gln Cys
 290 295 300
 45
 Leu
 305

<210> 13
 <211> 1188
 <212> ADN
 <213> Myceliophthora thermophila
 <400> 13
 cgacttgaaa cgccccaaat gaagtcctcc atcctcgcca gcgtcttcgc cacgggcgcc 60
 50
 gtggctcaaa gtggtccgtg gcagcaatgt ggtggcatcg gatggcaagg atcgaccgac 120
 tgtgtgtcgg gctaccactg cgtctaccag aacgattggt acagccagtg cgtgcctggc 180
 55
 gcggcgctcga caacgctgca gacatcgacc acgtccaggc ccaccgccac cagcaccgcc 240
 cctccgctcgt ccaccacctc gcctagcaag ggcaagctga agtggctcgg cagcaacgag 300
 tcgggcgccc agttcgggga gggcaattac cccggcctct ggggcaagca cttcatcttc 360

ES 2 594 528 T3

ccgtcgactt cggcgattca gacgctcatc aatgatggat acaacatctt ccggatcgac 420
 5 ttctcgatgg agcgtctggt gcccaaccag ttgacgtcgt ccttcgacca gggttacctc 480
 cgcaacctga ccgaggtggt caacttcgtg acgaacgcgg gcaagtacgc cgtcctggac 540
 ccgcacaact acggccggta ctacggcaac atcatcacgg acacgaacgc gttccggacc 600
 10 ttctggacca acctggccaa gcagttcgcc tccaactcgc tcgtcatctt cgacaccaac 660
 aacgagtaca acacgatgga ccagaccctg gtgctcaacc tcaaccaggc cgccatcgac 720
 ggcatccggg ccgccggcgc gacctcgcag tacatcttcg tcgagggcaa cgcgtggagc 780
 15 ggggcctgga gctggaacac gaccaacacc aacatggccg cctgacgga cccgcagaac 840
 aagatcgtgt acgagatgca ccagtacctc gactcggaca gctcggggcac ccacgccgag 900
 20 tgcgtcagca gcaccatcgg cgcccagcgc gtcgtcggag ccaccagtg gtcccgcgcc 960
 aacggcaagc tcggcgtcct cggcgagttc gccggcggcg ccaacgccgt ctgccagcag 1020
 gccgtcaccg gcctcctcga ccacctccag gacaacagcg acgtctggct ggggtgccctc 1080
 25 tgggtgggccg ccggtccctg gtggggcgac tacatgtact cgttcgagcc tccttcgggc 1140
 accggctatg tcaactacaa ctcgatcttg aagaagtact tgccgtaa 1188

30

<210> 14
 <211> 389
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila

35

<400> 14

Met Lys Ser Ser Ile Leu Ala Ser Val Phe Ala Thr Gly Ala Val Ala
 1 5 10 15

40

Gln Ser Gly Pro Trp Gln Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Gln Gly Ser
 20 25 30

45

Thr Asp Cys Val Ser Gly Tyr His Cys Val Tyr Gln Asn Asp Trp Tyr
 35 40 45

50

Ser Gln Cys Val Pro Gly Ala Ala Ser Thr Thr Leu Gln Thr Ser Thr
 50 55 60

55

Thr Ser Arg Pro Thr Ala Thr Ser Thr Ala Pro Pro Ser Ser Thr Thr
 65 70 75 80

Ser Pro Ser Lys Gly Lys Leu Lys Trp Leu Gly Ser Asn Glu Ser Gly
 85 90 95

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

	325		330		335	
5	Thr Gly Leu Leu Asp His Leu Gln Asp Asn Ser Asp Val Trp Leu Gly	340	345	350		
10	Ala Leu Trp Trp Ala Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Met Tyr Ser	355	360	365		
15	Phe Glu Pro Pro Ser Gly Thr Gly Tyr Val Asn Tyr Asn Ser Ile Leu	370	375	380		
20	Lys Lys Tyr Leu Pro	385				
20	<210> 15					
	<211> 1232					
	<212> ADN					
	<213> Basidiomycete CBS 495.95					
25	<400> 15					
	ggatccactt agtaacggcc gccagtggtc tggaaagcat gaagtctctc ttcctgtcac					60
	ttgtagcgac cgtcgcgctc agctcgccag tattctctgt cgagctctgg gggcaatgcg					120
30	gcggcattgg cttcagcgga agcaccgtct gtgatgcagg cgccggctgt gtgaagctca					180
	acgactatta ctctcaatgc caaccggcg ctcccactgc tacatccgcg gcgccaagta					240
	gcaacgcacc gtccggcact tcgacggcct cggccccctc ctccagcctt tgctctggca					300
35	gccgcacgcc gttccagttc ttcggtgtca acgaatccgg cgcgagttc ggcaacctga					360
	acatccccgg tgttctgggc accgactaca cctggccgct gccatccagc attgacttct					420
40	tcatgggcaa gggaatgaat accttccgta ttccgttcct catggagcgt cttgtcccc					480
	ctgccactgg catcacagga cctctcgacc agacgtactt gggcggcctg cagacgattg					540
	tcaactacat caccggcaaa ggcggctttg ctctcattga cccgcacaac tttatgatct					600
45	acaatggcca gacgatctcc agtaccagcg acttccagaa gttctggcag aacctcgcag					660
	gagtgtttaa atcgaacagt cacgtcatct tcgatgttat gaacgagcct cacgatattc					720
50	ccgcccagac cgtgttccaa ctgaaccaag ccgctgtcaa tggcatccgt gcgagcggtg					780
	cgacgtcgca gtcattctg gtcgagggca caagctggac tggagcctgg acctggacga					840
	cctctggcaa cagcgatgca ttcggtgcca ttaaggatcc caacaacaac gtcgcgatcc					900
55	agatgcatca gtacctgat agcgatggct ctggcacttc gcagacctgc gtgtctccca					960
	ccatcgggtc cgagcggttg caggctgcca ctcaatgggt gaagcagaac aacctcaagg					1020

ES 2 594 528 T3

gcttcctggg cgagatcggc gccggctcta actccgcttg catcagcgct gtgcagggtg 1080
 cgttgtgttc gatgcagcaa tctggtgtgt ggctcggcgc tctctggtgg gctgcgggccc 1140
 5 cgtggtgggg cgactactac cagtccatcg agccgccctc tggcccggcg gtgtccgcga 1200
 tcctcccgca ggcctgctg ccgttcgcgt aa 1232

10 <210> 16
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Basidiomycete CBS 495.95

15 <400> 16

Met Lys Ser Leu Phe Leu Ser Leu Val Ala Thr Val Ala Leu Ser Ser
 1 5 10 15

20 Pro Val Phe Ser Val Ala Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Phe
 20 25 30

25 Ser Gly Ser Thr Val Cys Asp Ala Gly Ala Gly Cys Val Lys Leu Asn
 35 40 45

30 Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Gln Pro Gly Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala
 50 55 60

35 Ala Pro Ser Ser Asn Ala Pro Ser Gly Thr Ser Thr Ala Ser Ala Pro
 65 70 75 80

40 Ser Ser Ser Leu Cys Ser Gly Ser Arg Thr Pro Phe Gln Phe Phe Gly
 85 90 95

45 Val Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Asn Leu Asn Ile Pro Gly Val
 100 105 110

50 Leu Gly Thr Asp Tyr Thr Trp Pro Ser Pro Ser Ser Ile Asp Phe Phe
 115 120 125

55 Met Gly Lys Gly Met Asn Thr Phe Arg Ile Pro Phe Leu Met Glu Arg
 130 135 140

Leu Val Pro Pro Ala Thr Gly Ile Thr Gly Pro Leu Asp Gln Thr Tyr
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Leu Gln Thr Ile Val Asn Tyr Ile Thr Gly Lys Gly Gly
 165 170 175

ES 2 594 528 T3

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

<210> 17
 <211> 1303

ES 2 594 528 T3

<212> ADN

<213> Basidiomycete CBS 495.95

<400> 17

5 ggaaagcgtc agtatggtga aatttgcgct tgtggcaact gtcggcgcaa tcttgagcgc 60
 ttctgcggcc aatgcggctt ctatctacca gcaatgtgga ggcattggat ggtctgggtc 120
 cactgtttgc gacgccggtc tcgcttgcgt tctcctcaat gcgtactact ttcagtgtt 180
 10 gacgcccgcc gcgggccaga caacgacggg ctcgggcgca ccggcgtcaa catcaacctc 240
 tcactcaacg gtcactacgg ggagctcaca ctcaacaacc gggacgacgg cgacgaaaac 300
 15 aactaccact ccgtcgacca ccacgaccct acccgccatc tctgtgtctg gtcgcgtctg 360
 ctctgggtcc aggacgaagt tcaagttctt cgggtgtgaat gaaagcggcg ccgaattcgg 420
 gaacactgct tggccagggc agctcgggaa agactataca tggccttcgc ctagcagcgt 480
 20 ggactacttc atgggggctg gattcaatac attccgtatc accttcttga tggagcgtat 540
 gagccctccg gctaccggac tcaactggccc attcaaccag acgtacctgt cgggcctcac 600
 25 caccattgtc gactacatca cgaacaaagg aggatacgct cttattgacc cccacaactt 660
 catgcgttac aacaacggca taatcagcag cacatctgac ttcgcgactt ggtggagcaa 720
 tttggccact gtattcaaat ccacgaagaa cgccatcttc gacatccaga acgagccgta 780
 30 cggaatcgat gcgcagaccg tatacgaact gaatcaagct gccatcaatt cgatccgcgc 840
 cgctggcgct acgtcacagt tgattctggt tgaaggaacg tcatacactg gagcttggac 900
 35 gtgggtctcg tccggaaacg gagctgcttt cgcggccggt acggatcctt acaacaacac 960
 ggcaattgaa atgcaccaat acctcgacag cgacggttct gggacaaacg aagactgtgt 1020
 ctctccacc attgggtcgc aacgtctcca agctgccact gcgtggctgc acaaacagg 1080
 40 actcaaggga ttcctcggag agacgggtgc tgggtcgaat tcccagtgca tcgacgccgt 1140
 gttcgatgaa ctttgctata tgcaacagca aggcggctcc tggatcgggtg cactctgggtg 1200
 45 ggctgcgggt ccctggtggg gcacgtacat ttactcgatt gaacctccga gcggtgccgc 1260
 tatcccagaa gtccttctc agggctctgc tccattctc tag 1303

50 <210> 18

<211> 429

<212> PRT

<213> Basidiomycete CBS 495.95

55 <400> 18

Met Val Lys Phe Ala Leu Val Ala Thr Val Gly Ala Ile Leu Ser Ala
 1 5 10 15

ES 2 594 528 T3

Ser Ala Ala Asn Ala Ala Ser Ile Tyr Gln Gln Cys Gly Gly Ile Gly
20 25 30

5
Trp Ser Gly Ser Thr Val Cys Asp Ala Gly Leu Ala Cys Val Ile Leu
35 40 45

10
Asn Ala Tyr Tyr Phe Gln Cys Leu Thr Pro Ala Ala Gly Gln Thr Thr
50 55 60

15
Thr Gly Ser Gly Ala Pro Ala Ser Thr Ser Thr Ser His Ser Thr Val
65 70 75 80

20
Thr Thr Gly Ser Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Thr Ala Thr Lys Thr
85 90 95

25
Thr Thr Thr Pro Ser Thr Thr Thr Thr Leu Pro Ala Ile Ser Val Ser
100 105 110

30
Gly Arg Val Cys Ser Gly Ser Arg Thr Lys Phe Lys Phe Phe Gly Val
115 120 125

35
Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Asn Thr Ala Trp Pro Gly Gln Leu
130 135 140

40
Gly Lys Asp Tyr Thr Trp Pro Ser Pro Ser Ser Val Asp Tyr Phe Met
145 150 155 160

45
Gly Ala Gly Phe Asn Thr Phe Arg Ile Thr Phe Leu Met Glu Arg Met
165 170 175

50
Ser Pro Pro Ala Thr Gly Leu Thr Gly Pro Phe Asn Gln Thr Tyr Leu
180 185 190

55
Ser Gly Leu Thr Thr Ile Val Asp Tyr Ile Thr Asn Lys Gly Gly Tyr
195 200 205

60
Ala Leu Ile Asp Pro His Asn Phe Met Arg Tyr Asn Asn Gly Ile Ile
210 215 220

65
Ser Ser Thr Ser Asp Phe Ala Thr Trp Trp Ser Asn Leu Ala Thr Val
225 230 235 240

70
Phe Lys Ser Thr Lys Asn Ala Ile Phe Asp Ile Gln Asn Glu Pro Tyr
245 250 255

ES 2 594 528 T3

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

<210> 19
 <211> 1580
 <212> ADN
 50 <213> Thielavia terrestris

<400> 19
 agccccccgt tcaggcacac ttggcatcag atcagcttag cagcgcctgc acagcatgaa 60
 55 gctctcgcag tcggccgcgc tggcggcact caccgcgacg gcgctcgccg ccccctcgcc 120
 cacgacgccg caggcgccga ggcaggcttc agccggctgc tcgtctgcgg tcacgctcga 180
 cgccagcacc aacgtttgga agaagtacac gctgcacccc aacagctact accgcaagga 240

ES 2 594 528 T3

5 ggttgaggcc gcggtggcgc agatctcggg cccggacctc gccgccaagg ccaagaaggt 300
 ggccgacgtc ggcaccttcc tgtggctcga ctcgatcgag aacatcggca agctggagcc 360
 5 ggcgatccag gacgtgccct gcgagaacat cctgggcctg gtcactctacg acctgccggg 420
 ccgcgactgc gcggccaagg cgtccaacgg cgagctcaag gtcggcgaga tcgaccgcta 480
 10 caagaccgag tacatcgaca gtgagtgtg cccccgggt tcgagaagag cgtgggggaa 540
 agggaaaggg ttgactgact gacacggcgc actgcagaga tcgtgtcgat cctcaaggca 600
 15 cacccaaca cggcgttcgc gctggtcata gagccggact cgctgccaa cctggtgacc 660
 aacagcaact tggacacgtg ctcgagcagc gcgtcgggct accgcgaagg cgtggcttac 720
 gccctcaaga acctcaacct gcccaacgtg atcatgtacc tcgacgccgg ccacggcggc 780
 20 tggctcggct gggacgcaa cctgcagccc ggcgcgcagg agctagcaa ggcgtacaag 840
 aacgccggct cgcceaagca gctccgcggc ttctcgacca acgtggccgg ctggaactcc 900
 25 tggtagactt ttttccattc catttcttct tcctcttctc tcttcgctcc cactctgcag 960
 cccccctcc ccaagcacc cactggcgtt ccggcttgct gactcggcct ccctttccc 1020
 gggcaccagg gatcaatcgc ccggcgaatt ctcccaggcg tccgacgcca agtacaacia 1080
 30 gtgccagaac gagaagatct acgtcagcac cttcggctcc gcgtccagt cggccggcat 1140
 gcccaaccac gccatcgtcg acacggggccg caacggcgtc accggcctgc gcaaggagtg 1200
 35 gggtagactg tgcaacgtca acggtgcagg ttcgttgtct tctttttctc ctcttttggt 1260
 tgcacgtcgt ggtccttttc aagcagccgt gtttggttg gggagatgga ctccggctga 1320
 tgttctgctt cctctctagg cttcggcgtg cgcgccgacga gcaacacggg cctcgagctg 1380
 40 gccgacgcgt tcgtgtgggt caagcccggc ggcgagtcgg acggcaccag cgacagctcg 1440
 tcgcccgcgt acgacagctt ctgcggcaag gacgacgcct tcaagccctc gcccgaggcc 1500
 45 ggcacctgga acgaggccta cttcgagatg ctgctcaaga acgccgtgcc gtcggttctaa 1560
 gacggtccag catcatccgg 1580

50 <210> 20
 <211> 396
 <212> PRT
 <213> *Thielavia terrestris*

55 <400> 20
 Met Lys Leu Ser Gln Ser Ala Ala Leu Ala Ala Leu Thr Ala Thr Ala
 1 5 10 15

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Trp Asp Gln Ser Pro Gly Glu Phe Ser Gln Ala Ser Asp Ala Lys Tyr
 260 265 270

5
 Asn Lys Cys Gln Asn Glu Lys Ile Tyr Val Ser Thr Phe Gly Ser Ala
 275 280 285

10
 Leu Gln Ser Ala Gly Met Pro Asn His Ala Ile Val Asp Thr Gly Arg
 290 295 300

15
 Asn Gly Val Thr Gly Leu Arg Lys Glu Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val
 305 310 315 320

20
 Asn Gly Ala Gly Phe Gly Val Arg Pro Thr Ser Asn Thr Gly Leu Glu
 325 330 335

25
 Leu Ala Asp Ala Phe Val Trp Val Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly
 340 345 350

30
 Thr Ser Asp Ser Ser Ser Pro Arg Tyr Asp Ser Phe Cys Gly Lys Asp
 355 360 365

35
 Asp Ala Phe Lys Pro Ser Pro Glu Ala Gly Thr Trp Asn Glu Ala Tyr
 370 375 380

40
 Phe Glu Met Leu Leu Lys Asn Ala Val Pro Ser Phe
 385 390 395

<210> 21
 <211> 1203
 <212> ADN
 <213> Thielavia terrestris

<400> 21
 atgaagtacc tcaacctcct cgcagctctc ctgcgctcgc ctctctctc cctcgctgca 60
 45
 cccagcatcg aggccagaca gtcgaacgtc aaccataca tcggcaagag cccgctcggt 120
 attaggtcgt acgccccaaa gcttgaggag accgtcagga ccttccagca acgtggcgac 180
 50
 cagctcaacg ctgcgaggac acggacggtg cagaacggtg cgactttcgc ctggatctcg 240
 gataccaatg gtattggagc cattcgacct ctcatccaag atgctctcgc ccagcaggct 300
 cgcaactggac agaaggatcat cgtccaaatc gtcgtctaca acctcccaga tcgcgactgc 360
 55
 tctgccaacg cctcgactgg agagttcacc gtaggaaacg acggtctcaa ccgatacaag 420
 aactttgtca acaccatcgc ccgcgagctc tcgactgctg acgctgacaa gctccacttt 480

ES 2 594 528 T3

gccctcctcc tcgaaccgga cgcacttgcc aacctcgtca ccaacgcgaa tgccccccagg 540
 tgccgaatcg ccgctcccgc ttacaaggag ggtatcgctt acaccctcgc caccttgctc 600
 5 aagcccaacg tcgacgtcta catcgacgcc gccaacgggtg gctggctcgg ctggaacgac 660
 aacctccgcc ccttcgccga actccttcaag gaagtctacg acctcgcccg ccgcatcaac 720
 cccaacgcca aggtccgcgg cgtccccgtc aacgtctcca actacaacca gtaccgcgct 780
 10 gaagtccgcg agcccttcac cgagtgggaag gacgcctggg acgagagccg ctacgtcaac 840
 gtcctcacc cgcacctcaa cgccgctcggc ttctccgcgc acttcatcgt tgaccaggga 900
 15 cgcgggtggca agggcgggat caggacggag tggggccagt ggtgcaacgt taggaacgct 960
 gggttcggta tcaggcctac tgcggatcag ggcgtgctcc agaaccgaa tgtggatgcg 1020
 attgtgtggg ttaagccggg tggagagtcg gatggcacga gtgattgaa ctcgaacagg 1080
 20 tatgatccta cgtgcaggag tccggtggcg catgttcccg ctctgagggc tggccagtgg 1140
 ttcaacgagt atgttgtaa cctcgttttg aacgctaacc cccctcttga gcctacctgg 1200
 25 taa 1203

<210> 22
 <211> 400
 30 <212> PRT
 <213> *Thielavia terrestris*
 <400> 22

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

	Asn	Val	Asp	Ala	Ile	Val	Trp	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Glu	Ser	Asp	Gly		
				340					345					350				
5	Thr	Ser	Asp	Leu	Asn	Ser	Asn	Arg	Tyr	Asp	Pro	Thr	Cys	Arg	Ser	Pro		
			355					360					365					
10	Val	Ala	His	Val	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Gly	Gln	Trp	Phe	Asn	Glu	Tyr		
		370					375					380						
15	Val	Val	Asn	Leu	Val	Leu	Asn	Ala	Asn	Pro	Pro	Leu	Glu	Pro	Thr	Trp		
	385					390					395					400		
	<210>	23																
	<211>	1501																
	<212>	ADN																
20	<213>	Thielavia terrestris																
	<400>	23																
	g	c	c	g	t	t	g	t	t	g	t	t	g	t	c	a		60
25	c	t	c	c	c	c	t	t	t	t	g	t	g	t	c	a		120
	c	c	a	a	c	g	t	g	c	a	c	g	a	c	t	t		180
	g	a	c	t	g	g	a	a	c	t	c	c	t	c	g	t		240
30	g	g	g	g	t	c	g	a	a	a	c	t	g	t	g	a		300
	g	g	c	g	t	c	a	a	c	c	a	c	c	g	a	c		360
35	t	a	t	t	t	c	a	a	a	g	g	c	a	a	c	g		420
	t	c	g	g	a	t	g	g	a	a	c	a	c	t	c	a		480
	c	t	c	t	c	c	a	c	g	c	t	c	c	a	c	c		540
40	g	g	t	g	g	c	a	a	c	t	a	c	g	t	c	a		600
	c	a	g	t	g	t	c	c	c	c	g	a	c	a	c	c		660
45	t	g	c	a	a	c	g	a	a	c	c	a	a	c	c	c		720
	t	g	c	g	c	c	a	a	c	g	t	c	g	a	c	a		780
	a	a	g	a	g	c	t	a	c	t	a	c	t	a	c	c		840
50	c	g	t	t	c	a	t	c	a	c	a	c	c	a	c	a		900
	g	t	g	c	a	g	a	a	c	g	g	t	c	g	c	c		960
55	g	g	c	t	g	c	a	c	c	t	c	g	g	c	c	a		1020
	g	g	c	a	t	g	g	t	g	c	t	g	c	a	c	c		1080
	a	g	c	g	g	c	a	a	c	a	c	c	a	a	c	a		1140

ES 2 594 528 T3

taccocggaca cccacgtggt cttctccaac atccgctggg gagacatcgg ctcgacggtc 1200
 5 caggtctcgg gaggcggcaa cggcggctcg accaccacca cgtcgaccac cacgctgagg 1260
 acctcgacca cgaccaccac caccgccccg acggccactg ccacgcactg gggacaatgc 1320
 ggcggaatcg gggtagtca accgcctcct gcattctggt gaggaagtta actaacgtgg 1380
 10 cctacgcagt ggactggacc gaccgtctgc gaatcgccgt acgcatgcaa ggagctgaac 1440
 ccctgggtact accagtgcct ctaaagtatt gcagtgaagc catactccgt gctcggcatg 1500
 15 g 1501

<210> 24
 <211> 464
 <212> PRT
 20 <213> Thielavia terrestris
 <400> 24

25 Met Gly Gln Lys Thr Leu His Gly Phe Ala Ala Thr Ala Leu Ala Val
 1 5 10 15

30 Leu Pro Phe Val Lys Ala Gln Gln Pro Gly Asn Phe Thr Pro Glu Val
 20 25 30

35 His Pro Gln Leu Pro Thr Trp Lys Cys Thr Thr Ala Gly Gly Cys Val
 35 40 45

40 Gln Gln Asp Thr Ser Val Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Ile His
 50 55 60

45 Asn Ala Asp Gly Thr Ala Ser Cys Thr Thr Ser Ser Gly Val Asp His
 65 70 75 80

50 Thr Leu Cys Pro Asp Glu Ala Thr Cys Ala Lys Asn Cys Phe Val Glu
 85 90 95

55 Gly Val Asn Tyr Thr Ser Ser Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu
 100 105 110

60 Thr Met Arg Gln Tyr Phe Lys Gly Ser Asn Gly Gln Thr Asn Ser Val
 115 120 125

65 Ser Pro Arg Leu Tyr Leu Leu Gly Ser Asp Gly Asn Tyr Val Met Leu
 130 135 140

ES 2 594 528 T3

Lys Leu Leu Gly Gln Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Leu Ser Thr Leu
 145 150 155 160

5 Pro Cys Gly Glu Asn Gly Ala Leu Tyr Leu Ser Glu Met Asp Ala Thr
 165 170 175

10 Gly Gly Arg Asn Gln Tyr Asn Thr Gly Gly Ala Asn Tyr Gly Ser Gly
 180 185 190

15 Tyr Cys Asp Ala Gln Cys Pro Val Gln Thr Trp Met Asn Gly Thr Leu
 195 200 205

20 Asn Thr Asn Gly Gln Gly Tyr Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Leu Glu
 210 215 220

25 Ala Asn Ser Arg Ala Asn Ala Met Thr Pro His Pro Cys Ala Asn Gly
 225 230 235 240

30 Ser Cys Asp Lys Ser Gly Cys Gly Leu Asn Pro Tyr Ala Glu Gly Tyr
 245 250 255

35 Lys Ser Tyr Tyr Gly Pro Gly Leu Thr Val Asp Thr Ser Lys Pro Phe
 260 265 270

40 Thr Ile Ile Thr Arg Phe Ile Thr Asp Asp Gly Thr Thr Ser Gly Thr
 275 280 285

45 Leu Asn Gln Ile Gln Arg Ile Tyr Val Gln Asn Gly Lys Thr Val Ala
 290 295 300

50 Ser Ala Ala Ser Gly Gly Asp Ile Ile Thr Ala Ser Gly Cys Thr Ser
 305 310 315 320

55 Ala Gln Ala Phe Gly Gly Leu Ala Asn Met Gly Ala Ala Leu Gly Arg
 325 330 335

60 Gly Met Val Leu Thr Phe Ser Ile Trp Asn Asp Ala Gly Gly Tyr Met
 340 345 350

65 Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Asn Gly Pro Cys Ser Ser Thr Glu Gly
 355 360 365

70 Asn Pro Ser Asn Ile Leu Ala Asn Tyr Pro Asp Thr His Val Val Phe
 370 375 380

ES 2 594 528 T3

Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Val Gln Val Ser Gly
 385 390 395 400

5 Gly Gly Asn Gly Gly Ser Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Thr Leu Arg
 405 410 415

10 Thr Ser Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Pro Thr Ala Thr Ala Thr His
 420 425 430

15 Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Val Cys Glu
 435 440 445

20 Ser Pro Tyr Ala Cys Lys Glu Leu Asn Pro Trp Tyr Tyr Gln Cys Leu
 450 455 460

<210> 25
 <211> 1368
 <212> ADN
 25 <213> Thielavia terrestris

<400> 25
 accgatccgc tcgaagatgg cgcccaagtc tacagttctg gccgcctggc tgctctcctc 60
 30 gctggccgcg gcccagcaga tcggcaaagc cgtgcccagag gtccacccca aactgacaac 120
 gcagaagtgc actctccgcg gcgggtgcaa gcctgtccgc acctcggtcg tgctcgactc 180
 gtccgcgcgc tcgctgcaca aggtcgggga cccaacacc agctgcagcg tcggcggcga 240
 35 cctgtgctcg gacgcgaagt cgtgcgcaa gaactgcgcg ctcgagggcg tcgactacgc 300
 ggcccacggc gtggcgacca agggcgacgc cctcacgctg caccagtggc tcaagggggc 360
 40 cgacggcacc tacaggaccg tctcgccgcg cgtatacctc ctgggcgagg acgggaagaa 420
 ctacgaggac ttcaagctgc tcaacgccga gctcagcttc gacgtcgacg tgtcccagct 480
 cgtctgcggc atgaacggcg ccctgtactt ctccgagatg gagatggacg gcggccgcag 540
 45 cccgctgaac ccggcgggcg ccacgtacgg cacgggctac tgcgacgcgc agtgccccaa 600
 gttggacttt atcaacggcg aggtatttct tctctcttct gtttttcttt tccatcgctt 660
 50 tttctgaccg gaatccgcc tcttagctca acaccaacca cacgtacggg gcgtgctgca 720
 acgagatgga catctgggag gccaacgcgc tggcgcaggc gctcacgccg caccctgca 780
 acgcgacgcg ggtgtacaag tgcgacacgg cggacgagtg cgggcagccg gtgggcgtgt 840
 55 gcgacgaatg ggggtgctcg tacaaccgct ccaacttcgg ggtcaaggac tactacgggc 900
 gcaacctgac ggtggacacg aaccgcaagt tcacgggtgac gacgcagttc gtgacgtcca 960

ES 2 594 528 T3

acgggcgggc ggacggcgag ctgaccgaga tccggcggct gtacgtgcag gacggcgtgg 1020
 tgatccagaa ccacgcggtc acggcgggcg gggcgacgta cgacagcatc acggacggct 1080
 5 tctgcaacgc gacggccacc tggacgcagc agcggggcg gctcgcgcgc atgggcgagg 1140
 ccatcggccg cggcatggtg ctcatcttca gcctgtgggt tgacaacggc ggcttcatga 1200
 actggctcga cagcggcaac gccgggccct gcaacgccac cgagggcgac cgggccctga 1260
 10 tcctgcagca gcaccggac gccagcgtca ctttctccaa catccgatgg ggcgagatcg 1320
 gcagcacgta caagagcgag tgcagccact agagtagagc ttgtaatt 1368
 15
 <210> 26
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> *Thielavia terrestris*
 20
 <400> 26
 Met Ala Pro Lys Ser Thr Val Leu Ala Ala Trp Leu Leu Ser Ser Leu
 1 5 10 15
 25 Ala Ala Ala Gln Gln Ile Gly Lys Ala Val Pro Glu Val His Pro Lys
 20 25 30
 30 Leu Thr Thr Gln Lys Cys Thr Leu Arg Gly Gly Cys Lys Pro Val Arg
 35 40
 35 Thr Ser Val Val Leu Asp Ser Ser Ala Arg Ser Leu His Lys Val Gly
 50 55 60
 40 Asp Pro Asn Thr Ser Cys Ser Val Gly Gly Asp Leu Cys Ser Asp Ala
 65 70 75 80
 45 Lys Ser Cys Gly Lys Asn Cys Ala Leu Glu Gly Val Asp Tyr Ala Ala
 85 90 95
 His Gly Val Ala Thr Lys Gly Asp Ala Leu Thr Leu His Gln Trp Leu
 100 105 110
 50 Lys Gly Ala Asp Gly Thr Tyr Arg Thr Val Ser Pro Arg Val Tyr Leu
 115 120 125
 55 Leu Gly Glu Asp Gly Lys Asn Tyr Glu Asp Phe Lys Leu Leu Asn Ala
 130 135 140
 Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Gln Leu Val Cys Gly Met Asn

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Asn Ala Thr Glu Gly Asp Pro Ala Leu Ile Leu Gln Gln His Pro Asp
 385 390 395 400

5 Ala Ser Val Thr Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser Thr
 405 410 415

10 Tyr Lys Ser Glu Cys Ser His
 420

<210> 27
 <211> 1011
 15 <212> ADN
 <213> Thielavia terrestris

<400> 27
 20 atgaccctac ggctccctgt catcagcctg ctggcctcgc tggcagcagg cgccgtcgtc 60
 gtcccacggg cggagtttca cccccctctc ccgacttggg aatgcacgac ctccgggggc 120
 tgcgtgcagc agaacaccag cgtcgtcctg gaccgtgact cgaagtacgc cgcacacagc 180
 25 gccggctcgc ggacggaatc ggattacgcg gcaatgggag tgtccacttc gggcaatgcc 240
 gtgacgctgt accactacgt caagaccaac ggcaccctcg tccccgcttc gccgcgcatc 300
 tacctcctgg gcgcggacgg caagtacgtg cttatggacc tcctcaacca ggagctgtcg 360
 30 gtggacgtcg acttctcggc gctgccgtgc ggcgagaacg gggccttcta cctgtccgag 420
 atggcggcgg acgggcgggg cgacgcgggg gcgggcgacg ggtactgcga cgcgcagtgc 480
 35 cagggctact gctgcaacga gatggacatc ctcgaggcca actcgatggc gacggccatg 540
 acgccgcacc cgtgcaaggg caacaactgc gaccgcagcg gctgcggcta caaccgtac 600
 gccagcggcc agcgcggctt ctacgggccc ggcaagacgg tcgacacgag caagcccttc 660
 40 accgtcgtca cgcagttcgc cgccagcggc ggcaagctga cccagatcac ccgcaagtac 720
 atccagaacg gccgggagat cggcggcggc ggcaccatct ccagctgcgg ctccgagtct 780
 45 tcgacgggcg gcctgaccgg catgggagcag gcgctggggc gcggaatggt gctggccatg 840
 agcatctgga acgacgcggc ccaggagatg gcatggctcg atgccggcaa caacggccct 900
 tgcgccagtg gccagggcag cccgtccgtc attcagtcgc agcatcccga caccacgtc 960
 50 gtctttctcca acatcaggtg gggcgacatc gggctctacca cgaagaacta g 1011

<210> 28
 55 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris

<400> 28

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Ile Gln Asn Gly Arg Glu Ile Gly Gly Gly Gly Thr Ile Ser Ser Cys
 245 250 255
 5
 Gly Ser Glu Ser Ser Thr Gly Gly Leu Thr Gly Met Gly Glu Ala Leu
 260 265 270
 10
 Gly Arg Gly Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Asn Asp Ala Ala Gln
 275 280 285
 15
 Glu Met Ala Trp Leu Asp Ala Gly Asn Asn Gly Pro Cys Ala Ser Gly
 290 295 300
 20
 Gln Gly Ser Pro Ser Val Ile Gln Ser Gln His Pro Asp Thr His Val
 305 310 315 320
 25
 Val Phe Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Thr Lys Asn
 325 330 335

<210> 29
 <211> 1480
 <212> ADN
 30 <213> Cladorrhinum foecundissimum
 <400> 29
 gatccgaatt cctcctctcg ttcttttagtc acagaccaga catctgcca cgatggttca 60
 35 caagttcgcc ctctcaccg gcctcgccgc ctccctcgca tctgcccagc agatcggcac 120
 cgtcgtcccc gagtctcacc ccaagcttcc caccaagcgc tgcactctcg ccggtggctg 180
 ccagaccgtc gacacctca tcgtcatcga cgccttccag cgtcccctcc acaagatcgg 240
 40 cgacccttcc actccttgcg tcgtcggcgg ccctctctgc cccgacgcca agtcctgcgc 300
 tgagaactgc gcgctcgagg gtgtcgacta tgcctcctgg ggcatacaaga ccgagggcga 360
 45 cgccctaact ctcaaccagt ggatgcccga cccggcgaac cctggccagt acaagacgac 420
 tactccccgt acttaccttg ttgctgagga cggcaagaac tacgaggatg tgaagctcct 480
 ggctaaggag atctcgtttg atgccgatgt cagcaacctt ccctgcggca tgaacggtgc 540
 50 tttctacttg tctgagatgt tgatggatgg tggacgtggc gacctcaacc ctgctggtgc 600
 cgagtatggt accggttact gtgatgcgca gtgcttcaag ttggatttca tcaacggcga 660
 55 ggccaacatc gacaaaagc acggcgcctg ctgcaacgaa atggacattt tcgaatccaa 720
 ctcgcgcgcc aagaccttcg tccccaccc ctgcaacatc acgcaggtct acaagtgcga 780
 aggcgaagac gagtgcggcc agcccgtcgg cgtgtgcgac aagtgggggt gcggcttcaa 840

ES 2 594 528 T3

cgagtacaaa tggggcgtcg agtccttcta cggccggggc tcgcagttcg ccatcgactc 900
 ctccaagaag ttcaccgtca ccacgcagtt cctgaccgac aacggcaagg aggacggcgt 960
 5 cctcgtcgag atccgccgct tgtggcacca ggatggcaag ctgatcaaga acaccgctat 1020
 ccaggttgag gagaactaca gcacggactc ggtgagcacc gagttctgcg agaagactgc 1080
 10 ttctttcacc atgcagcgcg gtgggtctcaa ggcgatgggc gaggctatcg gtcgtggtat 1140
 ggtgctggtt ttcagcatct gggcggatga ttcgggtttt atgaactggt tggatgcgga 1200
 gggtaatggc ccttgcagcg cgactgaggg cgatccgaag gagattgtca agaataagcc 1260
 15 ggatgctagg gttacgttct caaacattag gattggtgag gttggtagca cgtatgctcc 1320
 ggggtgggaag tgcggtgтта agagcagggt tgctaggggg cttactgctt cttaaggggg 1380
 20 gtgtgaagag aggaggaggt gttgttgggg gttggagatg ataattgggc gagatggtgt 1440
 agagcggggt ggttgatat gaatacgttg aattggatgt 1480

25 <210> 30
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> Cladorrhinum foecundissimum

30 <400> 30

Met Val His Lys Phe Ala Leu Leu Thr Gly Leu Ala Ala Ser Leu Ala
 1 5 10 15

35 Ser Ala Gln Gln Ile Gly Thr Val Val Pro Glu Ser His Pro Lys Leu
 20 25 30

40 Pro Thr Lys Arg Cys Thr Leu Ala Gly Gly Cys Gln Thr Val Asp Thr
 35 40 45

45 Ser Ile Val Ile Asp Ala Phe Gln Arg Pro Leu His Lys Ile Gly Asp
 50 55 60

50 Pro Ser Thr Pro Cys Val Val Gly Gly Pro Leu Cys Pro Asp Ala Lys
 65 70 75 80

55 Ser Cys Ala Glu Asn Cys Ala Leu Glu Gly Val Asp Tyr Ala Ser Trp
 85 90 95

Gly Ile Lys Thr Glu Gly Asp Ala Leu Thr Leu Asn Gln Trp Met Pro
 100 105 110

ES 2 594 528 T3

Asp Pro Ala Asn Pro Gly Gln Tyr Lys Thr Thr Thr Pro Arg Thr Tyr
 115 120 125

5 Leu Val Ala Glu Asp Gly Lys Asn Tyr Glu Asp Val Lys Leu Leu Ala
 130 135 140

10 Lys Glu Ile Ser Phe Asp Ala Asp Val Ser Asn Leu Pro Cys Gly Met
 145 150 155 160

15 Asn Gly Ala Phe Tyr Leu Ser Glu Met Leu Met Asp Gly Gly Arg Gly
 165 170 175

20 Asp Leu Asn Pro Ala Gly Ala Glu Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ala
 180 185 190

25 Gln Cys Phe Lys Leu Asp Phe Ile Asn Gly Glu Ala Asn Ile Asp Gln
 195 200 205

30 Lys His Gly Ala Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Phe Glu Ser Asn Ser
 210 215 220

35 Arg Ala Lys Thr Phe Val Pro His Pro Cys Asn Ile Thr Gln Val Tyr
 225 230 235 240

40 Lys Cys Glu Gly Glu Asp Glu Cys Gly Gln Pro Val Gly Val Cys Asp
 245 250 255

45 Lys Trp Gly Cys Gly Phe Asn Glu Tyr Lys Trp Gly Val Glu Ser Phe
 260 265 270

50 Tyr Gly Arg Gly Ser Gln Phe Ala Ile Asp Ser Ser Lys Lys Phe Thr
 275 280 285

55 Val Thr Thr Gln Phe Leu Thr Asp Asn Gly Lys Glu Asp Gly Val Leu
 290 295 300

60 Val Glu Ile Arg Arg Leu Trp His Gln Asp Gly Lys Leu Ile Lys Asn
 305 310 315 320

65 Thr Ala Ile Gln Val Glu Glu Asn Tyr Ser Thr Asp Ser Val Ser Thr
 325 330 335

70 Glu Phe Cys Glu Lys Thr Ala Ser Phe Thr Met Gln Arg Gly Gly Leu
 340 345 350

ES 2 594 528 T3

Lys Ala Met Gly Glu Ala Ile Gly Arg Gly Met Val Leu Val Phe Ser
355 360 365

5
Ile Trp Ala Asp Asp Ser Gly Phe Met Asn Trp Leu Asp Ala Glu Gly
370 375 380

10
Asn Gly Pro Cys Ser Ala Thr Glu Gly Asp Pro Lys Glu Ile Val Lys
385 390 395 400

15
Asn Lys Pro Asp Ala Arg Val Thr Phe Ser Asn Ile Arg Ile Gly Glu
405 410 415

20
Val Gly Ser Thr Tyr Ala Pro Gly Gly Lys Cys Gly Val Lys Ser Arg
420 425 430

25
Val Ala Arg Gly Leu Thr Ala Ser
435 440

30
<210> 31
<211> 1380
<212> ADN
<213> *Trichoderma reesei*

35
<400> 31
atggcgccct cagttacact gccgttgacc acggccatcc tggccattgc cgggctcgtc 60
gccgcccagc aaccgggtac cagcaccccc gaggtccatc ccaagttgac aacctacaag 120
tgtacaaagt ccgggggggtg cgtggcccag gacacctcgg tggtccttga ctggaactac 180
cgctggatgc acgacgcaa ctacaactcg tgcaccgtca acggcggcgt caacaccacg 240
ctctgccctg acgaggcgac ctgtggcaag aactgcttca tcgagggcgt cgactacgcc 300
gcctcggggcg tcacgacctc gggcagcagc ctcacatga accagtacat gccacgacg 360
tctggcggct acagcagcgt ctctcctcgg ctgtatctcc tggactctga cggtgagtac 420
gtgatgctga agctcaacgg ccaggagctg agcttogacg tcgacctctc tgctctgccg 480
tgtggagaga acggctcgtct ctacctgtct cagatggacg agaacggggg cgccaaccag 540
50 tataacacgg ccggtgcaa ctacgggagc ggctactgcg atgctcagtg ccccgctccag 600
acatggagga acggcaccct caaactagc caccagggct tctgctgcaa cgagatggat 660
atcctggagg gcaactcgag ggcgaatgcc ttgaccctc actcttgac ggccacggcc 720
55 tgcgactctg ccggttgagg cttcaacccc tatggcagcg gctacaaaag ctactacggc 780
cccggagata ccggttgacac ctccaagacc ttcacatca tcaccagtt caacacggac 840

ES 2 594 528 T3

aacggctcgc cctcgggcaa ccttgtgagc atcacccgca agtaccagca aaacggcgtc 900
gacatcccca gcgccagcc cggcggcgac accatctcgt cctgcccgtc cgcctcagcc 960
5 tacggcggcc tcgccacat gggcaaggcc ctgagcagcg gcatggtgct cgtgttcagc 1020
at ttggaacg acaacagcca gtacatgaac tggctcgaca gcggcaacgc cggcccctgc 1080
agcagcaccg agggcaaccc atccaacatc ctggccaaca accccaacac gcacgtcgtc 1140
10 ttctccaaca tccgctgggg agacattggg tctactacga actcgactgc gccccgccc 1200
ccgcctgcgt ccagcagcag gttttcgact acacggagga gctcgacgac ttcgagcagc 1260
15 ccgagctgca cgcagactca ctgggggcag tgcggtggca ttgggtacag cgggtgcaag 1320
acgtgcacgt cgggcactac gtgccagtat agcaacgact actactcgca atgcctttag 1380

20 <210> 32
<211> 459
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

25 <400> 32

Met Ala Pro Ser Val Thr Leu Pro Leu Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ile
1 5 10 15

30 Ala Arg Leu Val Ala Ala Gln Gln Pro Gly Thr Ser Thr Pro Glu Val
20 25 30

35 His Pro Lys Leu Thr Thr Tyr Lys Cys Thr Lys Ser Gly Gly Cys Val
35 40 45

40 Ala Gln Asp Thr Ser Val Val Leu Asp Trp Asn Tyr Arg Trp Met His
50 55 60

45 Asp Ala Asn Tyr Asn Ser Cys Thr Val Asn Gly Gly Val Asn Thr Thr
65 70 75 80

Leu Cys Pro Asp Glu Ala Thr Cys Gly Lys Asn Cys Phe Ile Glu Gly
85 90 95

50 Val Asp Tyr Ala Ala Ser Gly Val Thr Thr Ser Gly Ser Ser Leu Thr
100 105 110

55 Met Asn Gln Tyr Met Pro Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Ser Ser Val Ser
115 120 125

Pro Arg Leu Tyr Leu Leu Asp Ser Asp Gly Glu Tyr Val Met Leu Lys

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

	Asn	Ile	Leu	Ala	Asn	Asn	Pro	Asn	Thr	His	Val	Val	Phe	Ser	Asn	Ile	
	370						375					380					
5	Arg	Trp	Gly	Asp	Ile	Gly	Ser	Thr	Thr	Asn	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Pro	
	385					390					395					400	
10	Pro	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Phe	Ser	Thr	Thr	Arg	Arg	Ser	Ser	Thr	
					405					410						415	
15	Thr	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Cys	Thr	Gln	Thr	His	Trp	Gly	Gln	Cys	Gly	
				420					425					430			
20	Gly	Ile	Gly	Tyr	Ser	Gly	Cys	Lys	Thr	Cys	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	
			435					440					445				
25	<210>	33															
	<211>	1545															
	<212>	ADN															
	<213>	Trichoderma reesei															
30	<400>	33															
	atgtatcgga	agttggccgt	catctcggcc	ttcttggcca	cagctcgtgc	tcagtcggcc											60
	tgcactctcc	aatcggagac	tcacccgect	ctgacatggc	agaaatgctc	gtctggtggc											120
35	acgtgcactc	aacagacagg	ctccgtggtc	atcgacgcca	actggcgctg	gactcacgct											180
	acgaacagca	gcacgaactg	ctacgatggc	aacacttggc	gctcgaccct	atgtcctgac											240
	aacgagacct	gcgcaagaa	ctgctgtctg	gacggtgccg	cctacgcgtc	cacgtacgga											300
40	gttaccacga	gcggtaacag	cctctccatt	ggctttgtca	cccagctctgc	gcagaagaac											360
	gttggcgctc	gcctttacct	tatggcgagc	gacacgacct	accaggaatt	caccctgctt											420
45	ggcaacgagt	tctctttcga	tgttgatggt	tcgcagctgc	cgtgcegctt	gaacggagct											480
	ctctacttcg	tgtccatgga	cgcggatggt	ggcgtgagca	agtatcccac	caacaccgct											540
	ggcgccaagt	acggcacggg	gtactgtgac	agccagtgtc	cccgcgatct	gaagttcatc											600
50	aatggccagg	ccaacgttga	gggctgggag	ccgtcatcca	acaacgcgaa	cacgggcatt											660
	ggaggacacg	gaagctgctg	ctctgagatg	gatatctggg	aggccaactc	catctccgag											720
55	gctcttacct	cccacccttg	cacgactgtc	ggccaggaga	tctgcgaggg	tgatgggtgc											780
	ggcggaactt	actccgataa	cagatatggc	ggcacttgcg	atcccgatgg	ctgcgactgg											840
	aaccataacc	gcctgggcaa	caccagcttc	tacggccctg	gctcaagctt	taccctcgat											900

ES 2 594 528 T3

accaccaaga aattgaccgt tgtcaccag ttcgagacgt cgggtgcat caaccgatac 960
 5 tatgtccaga atggcgtcac tttccagcag cccaacgccg agcttggtag ttactctggc 1020
 aacgagctca acgatgatta ctgcacagct gaggaggcag aattcggcgg atcctctttc 1080
 tcagacaagg gcggcctgac tcagttcaag aaggctacct ctggcggcat ggttctggtc 1140
 10 atgagtctgt gggatgatta ctacgccaac atgctgtggc tggactccac ctacccgaca 1200
 aacgagacct cctccacacc cggtgccgtg cgcggaagct gctccaccag ctccggtgct 1260
 cctgctcagg tcgaatctca gtctcccaac gccaaaggta ctttctccaa catcaagttc 1320
 15 ggacccattg gcagcaccgg caaccctagc ggcggcaacc ctcccggcgg aaaccgcct 1380
 ggcaccacca ccaccgccg cccagccact accactggaa gctctcccg acctaccag 1440
 20 tctcactacg gccagtgcgg cggattggc tacagcggcc ccacggtctg cgccagcggc 1500
 acaacttgcc aggtcctgaa cccttactac tctcagtgcc tgtaa 1545

25 <210> 34
 <211> 514
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

30 <400> 34

Met Tyr Arg Lys Leu Ala Val Ile Ser Ala Phe Leu Ala Thr Ala Arg
 1 5 10 15

35 Ala Gln Ser Ala Cys Thr Leu Gln Ser Glu Thr His Pro Pro Leu Thr
 20 25 30

40 Trp Gln Lys Cys Ser Ser Gly Gly Thr Cys Thr Gln Gln Thr Gly Ser
 35 40 45

45 Val Val Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Ala Thr Asn Ser Ser
 50 55 60

Thr Asn Cys Tyr Asp Gly Asn Thr Trp Ser Ser Thr Leu Cys Pro Asp
 65 70 75 80

50 Asn Glu Thr Cys Ala Lys Asn Cys Cys Leu Asp Gly Ala Ala Tyr Ala
 85 90 95

55 Ser Thr Tyr Gly Val Thr Thr Ser Gly Asn Ser Leu Ser Ile Gly Phe
 100 105 110

ES 2 594 528 T3

Val Thr Gln Ser Ala Gln Lys Asn Val Gly Ala Arg Leu Tyr Leu Met
115 120 125

5 Ala Ser Asp Thr Thr Tyr Gln Glu Phe Thr Leu Leu Gly Asn Glu Phe
130 135 140

10 Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Gln Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala
145 150 155 160

15 Leu Tyr Phe Val Ser Met Asp Ala Asp Gly Gly Val Ser Lys Tyr Pro
165 170 175

20 Thr Asn Thr Ala Gly Ala Lys Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln
180 185 190

25 Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly
195 200 205

30 Trp Glu Pro Ser Ser Asn Asn Ala Asn Thr Gly Ile Gly Gly His Gly
210 215 220

35 Ser Cys Cys Ser Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Glu
225 230 235 240

40 Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Thr Thr Val Gly Gln Glu Ile Cys Glu
245 250 255

45 Gly Asp Gly Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Asp Asn Arg Tyr Gly Gly Thr
260 265 270

50 Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp Trp Asn Pro Tyr Arg Leu Gly Asn Thr
275 280 285

55 Ser Phe Tyr Gly Pro Gly Ser Ser Phe Thr Leu Asp Thr Thr Lys Lys
290 295 300

60 Leu Thr Val Val Thr Gln Phe Glu Thr Ser Gly Ala Ile Asn Arg Tyr
305 310 315 320

65 Tyr Val Gln Asn Gly Val Thr Phe Gln Gln Pro Asn Ala Glu Leu Gly
325 330 335

70 Ser Tyr Ser Gly Asn Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Cys Thr Ala Glu Glu
340 345 350

ES 2 594 528 T3

Ala Glu Phe Gly Gly Ser Ser Phe Ser Asp Lys Gly Gly Leu Thr Gln
355 360 365

5
Phe Lys Lys Ala Thr Ser Gly Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp
370 375 380

10
Asp Asp Tyr Tyr Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Thr Tyr Pro Thr
385 390 395 400

15
Asn Glu Thr Ser Ser Thr Pro Gly Ala Val Arg Gly Ser Cys Ser Thr
405 410 415

20
Ser Ser Gly Val Pro Ala Gln Val Glu Ser Gln Ser Pro Asn Ala Lys
420 425 430

25
Val Thr Phe Ser Asn Ile Lys Phe Gly Pro Ile Gly Ser Thr Gly Asn
435 440 445

30
Pro Ser Gly Gly Asn Pro Pro Gly Gly Asn Pro Pro Gly Thr Thr Thr
450 455 460

35
Thr Arg Arg Pro Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln
465 470 475 480

40
Ser His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Ser Gly Pro Thr Val
485 490 495

45
Cys Ala Ser Gly Thr Thr Cys Gln Val Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln
500 505 510

45
Cys Leu

50
<210> 35
<211> 1611
<212> ADN
<213> *Trichoderma reesei*

55
<400> 35
atgattgtcg gcattctcac cacgctggct acgctggcca cactcgcagc tagtgtgcct 60
ctagaggagc ggcaagcttg ctcaagcgtc tggttaattat gtgaaccctc tcaagagacc 120
caaatactga gatatgtcaa ggggccaatg tggtggccag aattggtcgg gtccgacttg 180
ctgtgcttcc ggaagcacat gcgtctactc caacgactat tactcccagt gtcttcccgg 240

ES 2 594 528 T3

cgctgcaagc tcaagctcgt ccacgcgcgc cgcgctcgacg acttctcgag tatccccac 300
 aacatccccg tcgagctccg cgacgcctcc acctggttct actactacca gagtacctcc 360
 5 agtcggatcg ggaaccgcta cgtattcagg caaccotttt gttgggggtca ctccttgggc 420
 caatgcatat tacgcctctg aagtttagcag cctcgctatt cctagcttga ctggagccat 480
 ggccactgct gcagcagctg tcgcaaaggt tccctctttt atgtggctgt aggtcctccc 540
 10 ggaaccaagg caatctgtta ctgaaggctc atcattcact gcagagatac tcttgacaag 600
 acccctctca tggagcaaac cttggccgac atccgcaccg ccaacaagaa tggcggtaac 660
 15 tatgccggac agtttgtggt gtatgacttg ccggatcgcg attgcgctgc ccttgcctcg 720
 aatggcgaat actctattgc cgatggtggc gtcgccaaat ataagaacta tatcgacacc 780
 attcgtcaaa ttgtcgtgga atattccgat atccggacc ccttggttat tggatgagt 840
 20 ttaaacacct gcctcccccc ccccttcct tcccttcccg ccggcatctt gtcgttgtgc 900
 taactattgt tccctcttcc agagcctgac tctcttgcca acctggtgac caacctcggt 960
 25 actccaaagt gtgccaatgc tcagtcagcc taccttgagt gcatcaacta cgccgtcaca 1020
 cagctgaacc ttccaaatgt tgcgatgat ttggacgctg gccatgcagg atggcttggc 1080
 tggccggcaa accaagacc ggccgctcag ctatttgcaa atgtttacaa gaatgcatcg 1140
 30 tctccgagag ctcttcgagg attggcaacc aatgtcgcca actacaacgg gtggaacatt 1200
 accagcccc catcgtacac gcaaggcaac gctgtctaca acgagaagct gtacatccac 1260
 35 gctattggac gtcttcttgc caatcacggc tggccaacg ccttcttcat cactgatcaa 1320
 ggtcgatcgg gaaagcagcc taccggacag caacagtggg gagactggtg caatgtgatc 1380
 ggcaccggat ttggtattcg cccatccgca aacactgggg actcgttgct ggattcgttt 1440
 40 gtctgggtca agccaggcgg cgagtgtgac ggcaccagcg acagcagtgc gccacgattt 1500
 gactcccact gtgcgctccc agatgccttg caaccggcgc ctcaagctgg tgcttggttc 1560
 45 caagcctact ttgtgcagct tctcacaac gcaaaccat cgttctgta a 1611

<210> 36
 <211> 471
 50 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*
 <400> 36

55 Met Ile Val Gly Ile Leu Thr Thr Leu Ala Thr Leu Ala Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Ser Val Pro Leu Glu Glu Arg Gln Ala Cys Ser Ser Val Trp Gly

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Pro Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr Leu Glu Cys Ile Asn Tyr
 260 265 270

5 Ala Val Thr Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp Ala
 275 280 285

10 Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Gln Asp Pro Ala Ala
 290 295 300

15 Gln Leu Phe Ala Asn Val Tyr Lys Asn Ala Ser Ser Pro Arg Ala Leu
 305 310 315 320

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

25 Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asn Ala Val Tyr Asn Glu Lys Leu
 340 345 350

30 Tyr Ile His Ala Ile Gly Arg Leu Leu Ala Asn His Gly Trp Ser Asn
 355 360 365

35 Ala Phe Phe Ile Thr Asp Gln Gly Arg Ser Gly Lys Gln Pro Thr Gly
 370 375 380

40 Gln Gln Gln Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe Gly
 385 390 395 400

45 Ile Arg Pro Ser Ala Asn Thr Gly Asp Ser Leu Leu Asp Ser Phe Val
 405 410 415

50 Trp Val Lys Pro Gly Gly Glu Cys Asp Gly Thr Ser Asp Ser Ser Ala
 420 425 430

55 Pro Arg Phe Asp Ser His Cys Ala Leu Pro Asp Ala Leu Gln Pro Ala
 435 440 445

Pro Gln Ala Gly Ala Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Val Gln Leu Leu Thr
 450 455 460

Asn Ala Asn Pro Ser Phe Leu
 465 470

<210> 37
 <211> 2046
 <212> ADN

ES 2 594 528 T3

<213> Humicola insolens

<400> 37

5	gccgtgacct tgcgcgcttt ggggtggcggg ggcgagtcgt ggacgggtgct tgctggtcgc	60
	cggccttccc ggcgatccgc gtgatgagag ggccaccaac ggcgggatga tgctccatgg	120
	ggaacttccc catggagaag agagagaaac ttgcggagcc gtgatctggg gaaagatgct	180
10	ccgtgtctcg tctatataac tcgagtctcc ccgagccctc aacaccacca gctctgatct	240
	caccatcccc atcgacaatc acgcaaacac agcagttgtc gggccattcc ttcagacaca	300
15	tcagtcaccc tccttcaaaa tgcgtaccgc caagttcgcc accctcgccg cccttgtggc	360
	ctcggccgcc gcccagcagg cgtgcagtct caccaccgag aggcaccctt ccctctcttg	420
	gaacaagtgc accgccggcg gccagtgcc gaccgtccag gcttccatca ctctcgactc	480
20	caactggcgc tggactcacc aggtgtctgg ctccaccaac tgctacacgg gcaacaagtg	540
	ggatactagc atctgcactg atgccaagtc gtgcgctcag aactgctgcg tcgatggtgc	600
	cgactacacc agcacctatg gcatcaccac caacgggtgat tcctgagcc tcaagttcgt	660
25	caccaagggc cagcactcga ccaacgtcgg ctgcgctacc tacctgatgg acggcgagga	720
	caagtatcag agtacgttct atcttcagcc ttctcgcgcc ttgaatcctg gctaacgttt	780
30	acacttcaca gccttcgagc tcctcggcaa cgagttcacc ttcgatgtcg atgtctccaa	840
	catcggtcgc ggtctcaacg gcgccctgta ctctgtctcc atggacgccg atggtggtct	900
	cagccgctat cctggcaaca aggtggtgca caagtacggt accggctact gcgatgctca	960
35	gtgcccccggt gacatcaagt tcatcaacgg cgaggccaac attgagggct ggaccggctc	1020
	caccaacgac cccaacgccg gcgcgggccg ctatggtacc tgctgctctg agatggatat	1080
40	ctgggaagcc aacaacatgg ctactgcctt cactcctcac ccttgacca tcattggcca	1140
	gagccgctgc gagggcgact cgtgcggtgg cacctacagc aacgagcgct acgccggcgt	1200
	ctgcgacccc gatggctgcg acttcaactc gtaccgccag ggcaacaaga ccttctacgg	1260
45	caagggcatg accgtcgaca ccaccaagaa gatcaactgtc gtcaccagct tcctcaagga	1320
	tgccaacggc gatctcggcg agatcaagcg cttctacgtc caggatggca agatcatccc	1380
50	caactccgag tccaccatcc ccggcgtcga gggcaattcc atcaccagc actggtgcca	1440
	ccgccagaag gttgcctttg gcgacattga cgacttcaac cgcaagggcg gcatgaagca	1500
	gatgggcaag gccctcgccg gccccatggt cctggtcgat tccatctggg atgaccacgc	1560
55	ctccaacatg ctctggctcg actcgacctt ccctgtcgat gccgctggca agccccggcg	1620
	cgagcgcggt gcctgccga ccacctcggg tgtccctgct gaggttgagg ccgaggcccc	1680

ES 2 594 528 T3

caacagcaac gtcgtcttct ccaacatccg cttcggcccc atcggctcga ccggtgctgg 1740
 tctccccggc gcgggcaacg gcggaacaa cggcggcaac ccccccccc ccaccaccac 1800
 5 cacctcctcg gctccggcca ccaccaccac cgccagcgtt ggcccccaagg ctggccgctg 1860
 gcagcagtg cggcgcatcg gcttcaactgg cccgaccagc tgcgaggagc cctacatttg 1920
 10 caccaagctc aacgactggt actctcagtg cctgtaaatt ctgagtcgct gactcgacga 1980
 tcacggccgg tttttgcatg aaaggaaaca aacgaccgcg ataaaaatgg agggtaatga 2040
 gatgtc 2046
 15
 <210> 38
 <211> 525
 <212> PRT
 <213> Humicola insolens
 20
 <400> 38
 Met Arg Thr Ala Lys Phe Ala Thr Leu Ala Ala Leu Val Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 25 Ala Ala Gln Gln Ala Cys Ser Leu Thr Thr Glu Arg His Pro Ser Leu
 20 25 30
 30 Ser Trp Asn Lys Cys Thr Ala Gly Gly Gln Cys Gln Thr Val Gln Ala
 35 40 45
 35 Ser Ile Thr Leu Asp Ser Asn Trp Arg Trp Thr His Gln Val Ser Gly
 50 55 60
 40 Ser Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn Lys Trp Asp Thr Ser Ile Cys Thr
 65 70 75 80
 45 Asp Ala Lys Ser Cys Ala Gln Asn Cys Cys Val Asp Gly Ala Asp Tyr
 85 90 95
 Thr Ser Thr Tyr Gly Ile Thr Thr Asn Gly Asp Ser Leu Ser Leu Lys
 100 105 110
 50 Phe Val Thr Lys Gly Gln His Ser Thr Asn Val Gly Ser Arg Thr Tyr
 115 120 125
 55 Leu Met Asp Gly Glu Asp Lys Tyr Gln Thr Phe Glu Leu Leu Gly Asn
 130 135 140
 Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser Asn Ile Gly Cys Gly Leu Asn

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Leu Val Met Ser Ile Trp Asp Asp His Ala Ser Asn Met Leu Trp Leu
 385 390 395 400

5 Asp Ser Thr Phe Pro Val Asp Ala Ala Gly Lys Pro Gly Ala Glu Arg
 405 410 415

10 Gly Ala Cys Pro Thr Thr Ser Gly Val Pro Ala Glu Val Glu Ala Glu
 420 425 430

15 Ala Pro Asn Ser Asn Val Val Phe Ser Asn Ile Arg Phe Gly Pro Ile
 435 440 445

20 Gly Ser Thr Val Ala Gly Leu Pro Gly Ala Gly Asn Gly Gly Asn Asn
 450 455 460

25 Gly Gly Asn Pro Pro Pro Pro Thr Thr Thr Thr Ser Ser Ala Pro Ala
 465 470 475 480

30 Thr Thr Thr Thr Ala Ser Ala Gly Pro Lys Ala Gly Arg Trp Gln Gln
 485 490 495

35 Cys Gly Gly Ile Gly Phe Thr Gly Pro Thr Gln Cys Glu Glu Pro Tyr
 500 505 510

40 Ile Cys Thr Lys Leu Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 515 520 525

<210> 39
 <211> 1812
 <212> ADN
 40 <213> Myceliophthora thermophila

<400> 39
 atggccaaga agcttttcat caccgccgcc cttgCGGctg cCGtgTtggc ggccccCGtc 60
 45 attgaggagc gccagaactg cggcgctgtg tggtaagaaa gccCGgtctg agtttcccat 120
 gactttctca tcgagtaatg gcataaggcc caccCttcg actgactgtg agaatcgatc 180
 aaatccagga ctcaatgCGg cggcaacggg tggcagggtc ccacatgctg cgcctcgggc 240
 50 tcgacctgCG ttgcgcagaa cgagtggTac tctcagtgcc tgcccaacaa tcaggtgacg 300
 agttccaaca ctccgTcgtc gacttccacc tcgcagcGca gcagcagcac ctccagcagc 360
 55 agcaccagga gcggcagctc ctCctcctcc accaccacgc cCctccCGt ctccagcccc 420
 gtgactagca ttcccggCGg tgcgaccacc acggcgagct actctggcaa ccccttctcg 480
 ggcgTccggc tcttcGCCaa cgactactac aggtccgagG tccacaatct cGCCattcct 540

ES 2 594 528 T3

agcatgaccg gtactctggc ggccaaggct tccgccgtcg ccgaagtccc tagcttccag 600
 5 tggctcgacc ggaacgtcac catcgacacc ctgatgggcc agactctgtc ccagatccgg 660
 gctgccaata atgccggtgc caatcctccc tatgctgggtg agttacatgg cggcgacttg 720
 ctttctcgtc cccacacctt cttgacggga tcggttacct gacctggagg caaaacaaaa 780
 10 ccagcccaac ttgtcgtcta cgacctcccc gaccgtgact gcgccgccgc tgcgtccaac 840
 ggcgagtttt cgattgcaaa cggcggcgcc gccaaactaca ggagctacat cgacgctatc 900
 15 cgcaagcaca tcattgagta ctccggacatc cggatcatcc tggttatcga gcccgactcg 960
 atggccaaca tggtgaccaa catgaacgtg gccaaagtgca gcaacgccgc gtcgacgtac 1020
 cacgagttga ccgtgtacgc gctcaagcag ctgaacctgc ccaacgtcgc catgtatctc 1080
 20 gacgccggcc acgccggctg gctcggctgg cccgcccaaca tccagcccgc cgccgacctg 1140
 tttgccggca tctacaatga cgccggcaag ccggctgccg tccgccgcct ggccactaac 1200
 25 gtcgccaaact acaacgcctg gagtatcgct tcggccccgt cgtacacgtc ccctaaccct 1260
 aactacgacg agaagcacta catcgaggcc ttcagcccgc tctgaacgc ggccggcttc 1320
 cccgcacgct tcattgtcga cactggccgc aacggcaaac aacctaccgg tatggttttt 1380
 30 ttcttttttt ttctctgttc ccctccccct tccccttcag ttggcgtcca caaggtctct 1440
 tagtcttgct tcttctcgga ccaaccttcc cccacccccca aaacgcaccg cccacaaccg 1500
 35 ttcgactcta tactcttggg aatgggcgcc gaaactgacc gttcgacagg ccaacaacag 1560
 tgggggtgact ggtgcaatgt caagggcact ggctttggcg tgcgcccgac ggccaacacg 1620
 ggccacgacc tggtcgatgc ctttgtctgg gtcaagcccg gcggcgagtc cgacggcaca 1680
 40 agcgacacca gcgccgcccg ctacgactac cactgcggcc tgtccgatgc cctgcagcct 1740
 gctccggagg ctggacagtg gttccaggcc tacttcgagc agctgctcac caacgccaac 1800
 45 ccgcccttct aa 1812

<210> 40

<211> 482

<212> PRT

50 <213> Myceliophthora thermophila

<400> 40

Met Ala Lys Lys Leu Phe Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Ala Val Leu
 55 1 5 10 15

Ala Ala Pro Val Ile Glu Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ala Val Trp Thr
 20 25 30

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

<210> 41
 <211> 1802
 <212> ADN
 <213> Myceliophthora thermophila

5
 <400> 41
 atggccaaga agcttttcat caccgccgcg cttgcggtg ccggtgttggc ggcccccgtc 60
 attgaggagc gccagaactg cggcgctgtg tggtaagaaa gcccggtccg agtctcccat 120
 10 gatttttctcg tcgagtaatg gcataagggc cacccttctg actgaccgtg agaatcgatc 180
 aaatccagga ctcaatgcbg cggtaacggg tggcaaggct ccacatgctg cgcctcgggc 240
 15 tcgacctgcbg ttgcbgagaa cbgagtggct tctcbgctg tgcccaacag ccaggtgcbg 300
 agttccacca ctcbgctgcbg gacttccacc tcbgcbgcbg gcaccagcbg ctcbgcbgcbg 360
 accaccagga gcbgcbgcbg ctcbctcbct tccaccacgb ccbcbgcbgcbg ctcbgcbgcbg 420
 20 gtgaccagcbg ttcbbgcbgcbg tgbgcbgcbg acbbgcbgcbg actctggcaa ccbcttctcbg 480
 gcbgcbgcbgcbg tcttcbgcbg cbgcbgcbgcbg aggtcbgcbg tccacaatct cbgcbgcbgcbg 540
 25 agcbgcbgcbg gcbgcbgcbgcbg gcbgcbgcbgcbg tcbgcbgcbgcbg cbgcbgcbgcbgcbg 600
 tggctcbgcbg gbaagcbgcbg cbgcbgcbgcbg ctgcbgcbgcbg agcbgcbgcbgcbg 660
 gctctcaata agbcbgcbgcbg caatcbctcbg tatgcbgcbgcbg agtcbgcbgcbgcbg 720
 30 tctcbgcbgcbgcbg tacccttctt gcbgcbgcbgcbg gttcbgcbgcbg cbgcbgcbgcbgcbg 780
 gcbgcbgcbgcbgcbg tcbgcbgcbgcbg cbctcbgcbgcbg cbgcbgcbgcbgcbg gcbgcbgcbgcbg 840
 35 gagttttcbgcbg ttgcbgcbgcbgcbg cbbgcbgcbgcbg aactcbgcbgcbg gcbgcbgcbgcbgcbg 900
 aagcbgcbgcbgcbgcbg ttgcbgcbgcbgcbg gcbgcbgcbgcbgcbg atcbgcbgcbgcbg 960
 gcbgcbgcbgcbgcbgcbg gcbgcbgcbgcbgcbgcbg aagcbgcbgcbgcbg acbcbgcbgcbgcbg 1020
 40 gagttgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbg 1080
 gcbg 1140
 45 gcbg 1200
 gcbg 1260
 tacgcbg 1320
 50 gcbg 1380
 cttttgtcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbgcbg 1440
 55 cctgcbg 1500
 tactcbg 1560
 ggtgcbg 1620

ES 2 594 528 T3

tggtcgatgc ctttgtctgg gtcaagcccc gcggcgagtc cgacggcaca agcgacacca 1680
 gcgcccggccg ctacgactac cactgcccgc tgtccgatgc cctgcagcct gcccccgagg 1740
 5 ctggacagtg gttccaggcc tacttctgagc agctgctcac caacgccaac ccgcccttct 1800
 aa 1802
 10
 <210> 42
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila
 15
 <400> 42
 Met Ala Lys Lys Leu Phe Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Ala Val Leu
 1 5 10 15
 20 Ala Ala Pro Val Ile Glu Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ala Val Trp Thr
 20 25 30
 25 Gln Cys Gly Gly Asn Gly Trp Gln Gly Pro Thr Cys Cys Ala Ser Gly
 35 40 45
 30 Ser Thr Cys Val Ala Gln Asn Glu Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Asn
 50 55 60
 35 Ser Gln Val Thr Ser Ser Thr Thr Pro Ser Ser Thr Ser Thr Ser Gln
 65 70 75 80
 40 Arg Ser Thr Ser Thr Ser Ser Ser Thr Thr Arg Ser Gly Ser Ser Ser
 85 90 95
 45 Ser Ser Ser Thr Thr Pro Pro Pro Val Ser Ser Pro Val Thr Ser Ile
 100 105 110
 50 Pro Gly Gly Ala Thr Ser Thr Ala Ser Tyr Ser Gly Asn Pro Phe Ser
 115 120 125
 55 Gly Val Arg Leu Phe Ala Asn Asp Tyr Tyr Arg Ser Glu Val His Asn
 130 135 140
 Leu Ala Ile Pro Ser Met Thr Gly Thr Leu Ala Ala Lys Ala Ser Ala
 145 150 155 160
 Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Gln Trp Leu Asp Arg Asn Val Thr Ile
 165 170 175

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

	405	410	415	
5	Ala Asn Thr Gly His Glu Leu Val Asp Ala Phe Val Trp Val Lys Pro 420 425 430			
10	Gly Gly Glu Ser Asp Gly Thr Ser Asp Thr Ser Ala Ala Arg Tyr Asp 435 440 445			
15	Tyr His Cys Gly Leu Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala Pro Glu Ala Gly 450 455 460			
20	Gln Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr Asn Ala Asn Pro 465 470 475 480			
25	Pro			
	<210> 43			
	<211> 1446			
	<212> ADN			
	<213> Thielavia terrestris			
30	<400> 43			
	atggctcaga agtccttct cgccgccgcc cttgcgggcca gcgccctcgc tgctcccgtc 60			
	gtcgaggagc gccagaactg cggttccgtc tggagccaat gcggcggcat tggctgggtcc 120			
35	ggcgcgacct gctgcgcttc gggcaatacc tgcgttgagc tgaaccgta ctactcgcag 180			
	tgcttgccca acagccaggt gactacctcg accagcaaga ccacctccac caccaccagg 240			
	agcagcacca ccagccacag cagcgggtccc accagcacga gcaccaccac caccagcagt 300			
40	cccgtgggtca ctaccccgcc gagtacctcc atccccggcg gtgcctcgtc aacggccagc 360			
	tgggtccggca acccgttctc gggcgtgcag atgtggggcca acgactacta cgcctccgag 420			
45	gtctcgtcgc tggccatccc cagcatgacg ggcgccaatgg ccaccaaggc ggccgaggtg 480			
	gccaaggtgc ccagcttcca gtggcttgac cgcaacgtca ccatcgacac gctgttcgcc 540			
	cacacgctgt cgcagatccg cgcggccaac cagaaaggcg ccaaccgccc ctacgcgggc 600			
50	atcttcgtgg tctacgacct tccggaccgc gactgcgccg ccgccgcgtc caacggcgag 660			
	ttctccatcg cgaacaacgg ggcggccaac tacaagacgt acatcgacgc gatccggagc 720			
55	ctcgtcatcc agtactcaga catccgcacg atcttcgtca tcgagcccga ctcgctggcc 780			
	aacatgggtga ccaacctgaa cgtggccaag tgcgccaacg ccgagtcgac ctacaaggag 840			
	ttgaccgtct acgcgctgca gcagctgaac ctgcccacag tggccatgta cctggacgcc 900			

ES 2 594 528 T3

```

ggccacgccg gctggctcgg ctggcccgcc aacatccagc cggccgcaa cctcttcgcc      960
gagatctaca cgagcgccgg caagccggcc gccgtgcgcg gcctcgccac caacgtggcc      1020
5 aactacaacg gctggagcct ggccacgccg ccctcgtaca cccagggcga ccccaactac      1080
gacgagagcc actacgtcca ggccctcgcc ccgctgctca ccgccaacgg cttccccgcc      1140
cacttcatca ccgacaccgg ccgcaacggc aagcagccga ccggacaacg gcaatgggga      1200
10 gactggtgca acgttatcgg aactggcttc gccgtgcgcc cgacgacaaa caccggcctc      1260
gacatcgagg acgccttcgt ctgggtcaag cccggcgggcg agtgcgacgg cacgagcaac      1320
15 acgacctctc cccgctacga ctaccactgc ggctgtcgg acgcgctgca gcctgctccg      1380
gaggccggca cttggttcca ggccacttc gagcagctcc tgaccaacgc caaccggccc      1440
ttttaa      1446
20
<210> 44
<211> 481
<212> PRT
25 <213> Thielavia terrestris
<400> 44
Met Ala Gln Lys Leu Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Ala Ser Ala Leu
30 1 5 10 15
Ala Ala Pro Val Val Glu Glu Arg Gln Asn Cys Gly Ser Val Trp Ser
35 20 25 30
Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Ser Gly Ala Thr Cys Cys Ala Ser Gly
40 35 40 45
Asn Thr Cys Val Glu Leu Asn Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu Pro Asn
50 55 60
45 Ser Gln Val Thr Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ser Thr Thr Thr Arg
65 70 75 80
Ser Ser Thr Thr Ser His Ser Ser Gly Pro Thr Ser Thr Ser Thr Thr
50 85 90 95
Thr Thr Ser Ser Pro Val Val Thr Thr Pro Pro Ser Thr Ser Ile Pro
55 100 105 110
Gly Gly Ala Ser Ser Thr Ala Ser Trp Ser Gly Asn Pro Phe Ser Gly
115 120 125

```

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

5 Leu Ala Pro Leu Leu Thr Ala Asn Gly Phe Pro Ala His Phe Ile Thr
 370 375 380
 Asp Thr Gly Arg Asn Gly Lys Gln Pro Thr Gly Gln Arg Gln Trp Gly
 385 390 395 400
 10 Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe Gly Val Arg Pro Thr Thr
 405 410 415
 15 Asn Thr Gly Leu Asp Ile Glu Asp Ala Phe Val Trp Val Lys Pro Gly
 420 425 430
 20 Gly Glu Cys Asp Gly Thr Ser Asn Thr Thr Ser Pro Arg Tyr Asp Tyr
 435 440 445
 25 His Cys Gly Leu Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala Pro Glu Ala Gly Thr
 450 455 460
 Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr Asn Ala Asn Pro Pro
 465 470 475 480
 30 Phe

35 <210> 45
 <211> 1593
 <212> ADN
 <213> Chaetomium thermophilum

40 <400> 45
 atgatgtaca agaagttcgc cgctctcgcc gccctcgtgg ctggcgccgc cgcccagcag 60
 gcttgctccc tcaccactga gaccacccc agactcactt ggaagcgctg cacctctggc 120
 45 ggcaactgct cgaccgtgaa cggcgccgtc accatcgatg ccaactggcg ctggactcac 180
 actgtttccg gctcgaccaa ctgctacacc ggcaacgagt gggatacctc catctgctct 240
 gatggcaaga gctgcgcca gacctgctgc gtcgacggcg ctgactactc ttcgacctat 300
 50 ggtatcacca ccagcgggta ctccctgaac ctcaagttcg tcaccaagca ccagcacggc 360
 accaatgtcg gctctcgtgt ctacctgatg gagaacgaca ccaagtacca gatgttcgag 420
 55 ctctcggca acgagttcac ctctgatgct gatgtctcta acctgggctg cggctctcaac 480
 ggcgcccctct acttcgtctc catggacgct gatggtggtg tgagcaagta ctctggcaac 540
 aaggctggcg ccaagtacgg taccggctac tgcgatgctc agtgcccgcg cgaccttaag 600

ES 2 594 528 T3

ttcatacaacg gcgaggccaa cattgagaac tggaccocctt cgaccaatga tgccaacgcc 660
 5 ggtttcggcc gctatggcag ctgctgctct gagatggata tctgggatgc caacaacatg 720
 gctactgcct tcaactcctca cccttgacc attatcggcc agagccgctg cgagggcaac 780
 agctgcggtg gcacctacag ctctgagcgc tatgctggtg tttgcgatcc tgatggctgc 840
 10 gacttcaacg cctaccgcca gggcgacaag accttctacg gcaagggcat gaccgtcgac 900
 accaccaaga agatgaccgt cgtcaccag ttccacaaga actcggctgg cgtcctcagc 960
 gagatcaagc gcttctacgt tcaggacggc aagatcattg ccaacgccga gtccaagatc 1020
 15 cccggcaacc ccggcaactc catcaccag gagtgggtgc atgccagaa ggtcgccttc 1080
 ggtgacatcg atgacttcaa ccgcaagggc ggtatggctc agatgagcaa ggccctcgag 1140
 20 ggccctatgg tcctggtcat gtccgtctgg gatgaccact acgccaacat gctctggctc 1200
 gactcgacct accccattga caaggccggc acccccggcg ccgagcgcgg tgcttgcccg 1260
 accacctccg gtgtccctgc cgagattgag gcccaggctc ccaacagcaa cgttatcttc 1320
 25 tccaacatcc gcttcggccc catcggctcg accgtccctg gcctcgacgg cagcaccccc 1380
 agcaaccgga ccgccaccgt tgctcctccc acttctacca ccaccagcgt gagaagcagc 1440
 30 actactcaga tttccacccc gactagccag cccggcggtc gcaccacca gaagtggggc 1500
 cagtgcggtg gtatcggcta caccggctgc actaactgcg ttgctggcac tacctgcaact 1560
 gagctcaacc cctggtacag ccagtgcctg taa 1593

35

<210> 46

<211> 530

<212> PRT

40 <213> Chaetomium thermophilum

<400> 46

45 Met Met Tyr Lys Lys Phe Ala Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Ala
 1 5 10 15

50 Ala Ala Gln Gln Ala Cys Ser Leu Thr Thr Glu Thr His Pro Arg Leu
 20 25 30

Thr Trp Lys Arg Cys Thr Ser Gly Gly Asn Cys Ser Thr Val Asn Gly
 35 40 45

55 Ala Val Thr Ile Asp Ala Asn Trp Arg Trp Thr His Thr Val Ser Gly
 50 55 60

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

<210> 47
 <211> 1434
 5 <212> ADN
 <213> *Chaetomium thermophilum*

 <400> 47
 10 atggctaagc agctgctgct cactgccgct cttgCGGCCA cttcGctggc tgcccctctc 60
 cttgaggagc gccagagctg ctccctccgtc tgggggtcaat gcggtggcat caattacaac 120
 ggccccgacct gctgccagtc cggcagtgtt tgcacttacc tgaatgactg gtacagccag 180
 15 tgcattccccg gtcaggctca gccccggcacg actagcacca cggctcggac caccagcacc 240
 agcaccacca gcacttcgtc ggtccgcccc accacctcga ataccctgt gacgactgct 300
 cccccgacga ccaccatccc gggcggcgcc tcgagcacgg ccagctacaa cggcaacccg 360
 20 ttttcgggtg ttcaactttg ggccaacacc tactactcgt ccgaggtgca cactttggcc 420
 atccccagct tgtctcctga gctggctgcc aaggccgcca aggtcGctga ggttcccagc 480
 25 ttccagtggc tcgaccgcaa tgtgactggt gacactctct tctccggcac tcttgccgaa 540
 atccgcgccg ccaaccagcg cggtgccaac ccgccttatg ccggcatttt cgtggtttat 600
 gacttaccag accgtgattg cgcggctgct gcttcgaacg gcgagtggtc tatcgccaac 660
 30 aatgggtgcca acaactacaa gcgctacatc gaccggatcc gtgagctcct tatccagtac 720
 tccgatatcc gcactattct ggtcattgaa cctgattccc tggccaacat ggtcaccaac 780
 35 atgaacgtcc agaagtgctc gaacgctgcc tccacttaca aggagcttac tgtctatgcc 840
 ctcaaacagc tcaatcttcc tcacgttgcc atgtacatgg atgctggcca cgctggctgg 900
 cttggctggc ccgccaacat ccagcctgct gctgagctct ttgctcaaat ctaccgagc 960
 40 gctggcaggc ccgctgctgt ccgcggtctt gcgaccaacg ttgccaacta caatgcttgg 1020
 tcgatcgcca gccctccgtc ctacacctct cctaaccgga actacgacga gaagcactat 1080
 45 attgaggcct ttgctcctct tctccgcaac cagggtctcg acgcaaagtt catcgtcgac 1140
 accggccgta acggcaagca gcccaactggc cagcttgaat ggggtcactg gtgcaatgct 1200
 aagggaaactg gcttcggtgt gcgccctact gctaacactg ggcatgaact tgttgatgct 1260
 50 ttcgtgtggg tcaagccccg tggcgagtcc gacggcacca gtgcggacac cagcgtgct 1320
 cgttatgact atcactgcgg cctttccgac gcactgactc cggcgcctga ggctggccaa 1380
 55 tggttccagc cttatttcga acagctgctc atcaatgcca accctccgct ctga 1434

<210> 48
 <211> 477

ES 2 594 528 T3

<212> PRT

<213> Chaetomium thermophilum

<400> 48

5

Met Ala Lys Gln Leu Leu Leu Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ser Leu
1 5 10 15

10

Ala Ala Pro Leu Leu Glu Glu Arg Gln Ser Cys Ser Ser Val Trp Gly
20 25 30

15

Gln Cys Gly Gly Ile Asn Tyr Asn Gly Pro Thr Cys Cys Gln Ser Gly
35 40 45

20

Ser Val Cys Thr Tyr Leu Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Ile Pro Gly
50 55 60

25

Gln Ala Gln Pro Gly Thr Thr Ser Thr Thr Ala Arg Thr Thr Ser Thr
65 70 75 80

30

Ser Thr Thr Ser Thr Ser Ser Val Arg Pro Thr Thr Ser Asn Thr Pro
85 90 95

35

Val Thr Thr Ala Pro Pro Thr Thr Thr Ile Pro Gly Gly Ala Ser Ser
100 105 110

Thr Ala Ser Tyr Asn Gly Asn Pro Phe Ser Gly Val Gln Leu Trp Ala
115 120 125

40

Asn Thr Tyr Tyr Ser Ser Glu Val His Thr Leu Ala Ile Pro Ser Leu
130 135 140

45

Ser Pro Glu Leu Ala Ala Lys Ala Ala Lys Val Ala Glu Val Pro Ser
145 150 155 160

Phe Gln Trp Leu Asp Arg Asn Val Thr Val Asp Thr Leu Phe Ser Gly
165 170 175

50

Thr Leu Ala Glu Ile Arg Ala Ala Asn Gln Arg Gly Ala Asn Pro Pro
180 185 190

55

Tyr Ala Gly Ile Phe Val Val Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala
195 200 205

Ala Ala Ala Ser Asn Gly Glu Trp Ser Ile Ala Asn Asn Gly Ala Asn
210 215 220

ES 2 594 528 T3

5 Asn Tyr Lys Arg Tyr Ile Asp Arg Ile Arg Glu Leu Leu Ile Gln Tyr
 225 230 235 240

Ser Asp Ile Arg Thr Ile Leu Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn
 245 250 255

10 Met Val Thr Asn Met Asn Val Gln Lys Cys Ser Asn Ala Ala Ser Thr
 260 265 270

15 Tyr Lys Glu Leu Thr Val Tyr Ala Leu Lys Gln Leu Asn Leu Pro His
 275 280 285

20 Val Ala Met Tyr Met Asp Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro
 290 295 300

25 Ala Asn Ile Gln Pro Ala Ala Glu Leu Phe Ala Gln Ile Tyr Arg Asp
 305 310 315 320

Ala Gly Arg Pro Ala Ala Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn
 325 330 335

30 Tyr Asn Ala Trp Ser Ile Ala Ser Pro Pro Ser Tyr Thr Ser Pro Asn
 340 345 350

35 Pro Asn Tyr Asp Glu Lys His Tyr Ile Glu Ala Phe Ala Pro Leu Leu
 355 360 365

40 Arg Asn Gln Gly Phe Asp Ala Lys Phe Ile Val Asp Thr Gly Arg Asn
 370 375 380

45 Gly Lys Gln Pro Thr Gly Gln Leu Glu Trp Gly His Trp Cys Asn Val
 385 390 395 400

Lys Gly Thr Gly Phe Gly Val Arg Pro Thr Ala Asn Thr Gly His Glu
 405 410 415

50 Leu Val Asp Ala Phe Val Trp Val Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly
 420 425 430

55 Thr Ser Ala Asp Thr Ser Ala Ala Arg Tyr Asp Tyr His Cys Gly Leu
 435 440 445

Ser Asp Ala Leu Thr Pro Ala Pro Glu Ala Gly Gln Trp Phe Gln Ala

ES 2 594 528 T3

	450		455		460	
	Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Ile Asn Ala Asn Pro Pro Leu					
5	465		470		475	
	<210> 49					
	<211> 1599					
10	<212> ADN					
	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>					
	<400> 49					
15	atgctggcct ccaccttctc ctaccgcatg tacaagaccg cgctcatcct ggccgcccctt					60
	ctgggctctg gccaggetca gcaggtcggt acttcccagg cggaagtgca tccgtccatg					120
	acctggcaga gctgcacggc tggcggcagc tgcaccacca acaacggcaa ggtggtcatc					180
20	gacgcgaact ggcgttgggt gcacaaagtc ggcgactaca ccaactgcta caccggcaac					240
	acctgggaca cgactatctg ccctgacgat gcgacctgcg catccaactg cgcccttgag					300
	ggtgccaaact acgaatccac ctatggtgtg accgccagcg gcaattccct ccgcctcaac					360
25	ttcgtcacca ccagccagca gaagaacatt ggctcgcgtc tgtacatgat gaaggacgac					420
	tcgacctacg agatgtttta gctgctgaac caggagttca cttcgatgt cgatgtctcc					480
30	aacctcccct gcggtctcaa cggtgctctg tactttgtcg ccatggacgc cgacggtggc					540
	atgtccaagt acccaaccaa caaggccggt gccaaagtacg gtactggata ctgtgactcg					600
	cagtgccctc gcgacctcaa gttcatcaac ggtcaggcca acgtcgaagg gtggcagccc					660
35	tcctccaacg atgccaatgc gggtaaccggc aaccacgggt cctgctgcgc ggagatggat					720
	atctgggagg ccaacagcat ctccacggcc ttcaccccc atccgtgcga cacgcccggc					780
40	caggtgatgt gcaccggtga tgcctgcggt ggcacctaca gtccgaccg ctacggcggc					840
	acctgcgacc ccgacggatg tgatttcaac tccttccgcc agggcaacaa gaccttctac					900
	ggccctggca tgaccgtcga caccaagagc aagtttaccg tcgtcaccca gttcatcacc					960
45	gacgacggca cctccagcgg caccctcaag gagatcaagc gttctacgt gcagaacggc					1020
	aaggtgatcc ccaactcgga gtcgacctgg accggcgtca gcggcaactc catcaccacc					1080
50	gagtactgca ccgccagaa gagcctgttc caggaccaga acgtcttcga aaagcacggc					1140
	ggcctcgagg gcatgggtgc tgcctcgcg cagggatggt ttctcgtcat gtccctgtgg					1200
	gatgatcact cggccaacat gctctggctc gacagcaact acccgaccac tgcctcttcc					1260
55	accactcccg gcgtcgcccg tggtaacctgc gacatctcct ccggcgtccc tgcggatgtc					1320
	gaggcgaacc accccgacgc ctacgtcgtc tactccaaca tcaaggtcgg ccccatcggc					1380

ES 2 594 528 T3

tcgaccttca acagcgggtgg ctcgaacccc ggtggcggaa ccaccacgac aactaccacc 1440
cagcctacta ccaccacgac cacggctgga aaccctggcg gcaccggagt cgcacagcac 1500
5 tatggccagt gtggtggaat cggatggacc ggaccacaaa cctgtgccag cccttatacc 1560
tgccagaagc tgaatgatta ttactctcag tgccctgtag 1599

10 <210> 50
<211> 532
<212> PRT
<213> Aspergillus fumigatus

15 <400> 50

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

20
Leu Ala Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gln Ala Gln Gln Val Gly Thr Ser
20 25 30

25
Gln Ala Glu Val His Pro Ser Met Thr Trp Gln Ser Cys Thr Ala Gly
35 40 45

30
Gly Ser Cys Thr Thr Asn Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp
50 55 60

35
Arg Trp Val His Lys Val Gly Asp Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn
65 70 75 80

40
Thr Trp Asp Thr Thr Ile Cys Pro Asp Asp Ala Thr Cys Ala Ser Asn
85 90 95

45
Cys Ala Leu Glu Gly Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Tyr Gly Val Thr Ala
100 105 110

50
Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Thr Ser Gln Gln Lys
115 120 125

55
Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Met Met Lys Asp Asp Ser Thr Tyr Glu
130 135 140

60
Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser
145 150 155 160

65
Asn Leu Pro Cys Gly Leu Asn Gly Ala Leu Tyr Phe Val Ala Met Asp
165 170 175

ES 2 594 528 T3

Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys
180 185 190

5 Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe
195 200 205

10 Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp
210 215 220

15 Ala Asn Ala Gly Thr Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp
225 230 235 240

Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala Phe Thr Pro His Pro Cys
245 250 255

20 Asp Thr Pro Gly Gln Val Met Cys Thr Gly Asp Ala Cys Gly Gly Thr
260 265 270

25 Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp
275 280 285

30 Phe Asn Ser Phe Arg Gln Gly Asn Lys Thr Phe Tyr Gly Pro Gly Met
290 295 300

35 Thr Val Asp Thr Lys Ser Lys Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr
305 310 315 320

Asp Asp Gly Thr Ser Ser Gly Thr Leu Lys Glu Ile Lys Arg Phe Tyr
325 330 335

40 Val Gln Asn Gly Lys Val Ile Pro Asn Ser Glu Ser Thr Trp Thr Gly
340 345 350

45 Val Ser Gly Asn Ser Ile Thr Thr Glu Tyr Cys Thr Ala Gln Lys Ser
355 360 365

50 Leu Phe Gln Asp Gln Asn Val Phe Glu Lys His Gly Gly Leu Glu Gly
370 375 380

55 Met Gly Ala Ala Leu Ala Gln Gly Met Val Leu Val Met Ser Leu Trp
385 390 395 400

Asp Asp His Ser Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Asn Tyr Pro Thr
405 410 415

ES 2 594 528 T3

5 Thr Ala Ser Ser Thr Thr Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Asp Ile
420 425 430

Ser Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ala Asn His Pro Asp Ala Tyr
435 440 445

10 Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro Ile Gly Ser Thr Phe Asn
450 455 460

15 Ser Gly Gly Ser Asn Pro Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr
465 470 475 480

20 Gln Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly Asn Pro Gly Gly Thr Gly
485 490 495

25 Val Ala Gln His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro
500 505 510

Thr Thr Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr
515 520 525

30 Ser Gln Cys Leu
530

35 <210> 51
<211> 1713
<212> ADN
<213> Aspergillus fumigatus

40 <400> 51
atgaagcacc ttgcatcttc catcgcattg actctactgt tgcctgccgt gcaggcccag 60
cagaccgtat ggggccaatg tatgttctgg ctgtcactgg aataagactg tatcaactgc 120
45 tgatatgctt ctagggtggcg gccaaaggctg gtctggcccc acgagctgtg ttgccggcgc 180
agcctgtagc aactgaatc cctgtatggt agatatcgtc ctgagtggag acttatactg 240
acttccttag actacgctca gtgtatcccc ggagccaccg cgacgtccac caccctcacg 300
50 acgacgacgg cggcgacgac gacatcccag accaccacca aacctaccac gactggtcca 360
actacatccg caccaccgt gaccgcatcc ggtaaccctt tcagcggcta ccagctgtat 420
55 gccaaaccct actactcctc cgagggtccat actctggcca tgccttctct gccagctcg 480
ctgcagccca aggctagtgc tgttgctgaa gtgccctcat ttgtttggct gtaagtggcc 540
ttatcccaat actgagacca actctctgac agtcgtagcg acgttgccgc caagggtgcc 600

ES 2 594 528 T3

actatgggaa cctacctggc cgacattcag gccaaagaaca aggccggcgc caaccctcct 660
 5 atcgctggta tcttcgtggt ctacgacttg ccggaccgtg actgcgccgc tctggccagt 720
 aatggcgagt actcaattgc caacaacggg gtggccaact acaaggcgta cattgacgcc 780
 atccgtgctc agctggtgaa gtactctgac gttcacacca tcctcgtcat cggtaggccg 840
 10 tacacctccg ttgcgcgccg cctttctctg acatcttgca gaacccgaca gcttggccaa 900
 cctggtgacc aacctcaacg tcgccaaatg cgccaatgcg cagagcgctt acctggagtg 960
 15 tgtcgactat gctctgaagc agctcaacct gcccaacgtc gccatgtacc tcgacgcagg 1020
 tatgcctcac ttcccgcatt ctgtatccct tccagacact aactcatcag gccatgcggg 1080
 ctggctcggg tggcccgccg acttggggccc cgccgcaaca ctcttcgccg aagtctacac 1140
 20 cgacgcgggt tccccgcggg ctgttcgtgg cctggccacc aacgtcgcca actacaacgc 1200
 ctggtcgctc agtacctgcc cctcctacac ccagggagac cccaactgcg acgagaagaa 1260
 25 gtacatcaac gccatggcgc ctcttctcaa ggaagccggc ttcgatgcc acttcatcat 1320
 ggatacctgt aagtgcttat tccaatcgcc gatgtgtgcc gactaatcaa tgtttcagcc 1380
 cggaatggcg tccagcccac gaagcaaac gcctgggggtg actggtgcaa cgtcatcggc 1440
 30 accggcttcg gtgttcgccc ctcgactaac accggcgatc cgctccagga tgccctttgtg 1500
 tggatcaagc ccggtggaga gagtgatggc acgtccaact cgacttcccc ccggtatgac 1560
 gcgcactgcg gatatagtga tgctctgcag cctgctcctg aggctggtac ttggttccag 1620
 35 gtatgtcatc cattagccag atgagggata agtgactgac ggacctaggc ctactttgag 1680
 cagcttctga ccaacgctaa cccgtccttt taa 1713

40
 <210> 52
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus fumigatus*

45
 <400> 52

Met Lys His Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Thr Leu Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 50
 Val Gln Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp
 20 25 30
 55
 Ser Gly Pro Thr Ser Cys Val Ala Gly Ala Ala Cys Ser Thr Leu Asn
 35 40 45

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Ala Thr Leu Phe Ala Lys Val Tyr Thr Asp Ala Gly Ser Pro Ala Ala
 290 295 300

5
 Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Trp Ser Leu
 305 310 315 320

10
 Ser Thr Cys Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asp Pro Asn Cys Asp Glu Lys
 325 330 335

15
 Lys Tyr Ile Asn Ala Met Ala Pro Leu Leu Lys Glu Ala Gly Phe Asp
 340 345 350

20
 Ala His Phe Ile Met Asp Thr Ser Arg Asn Gly Val Gln Pro Thr Lys
 355 360 365

Gln Asn Ala Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe Gly
 370 375 380

25
 Val Arg Pro Ser Thr Asn Thr Gly Asp Pro Leu Gln Asp Ala Phe Val
 385 390 395 400

30
 Trp Ile Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly Thr Ser Asn Ser Thr Ser
 405 410 415

35
 Pro Arg Tyr Asp Ala His Cys Gly Tyr Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala
 420 425 430

40
 Pro Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr
 435 440 445

Asn Ala Asn Pro Ser Phe
 450

45
 <210> 53
 <211> 2586
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus oryzae*

50
 <400> 53
 atgaagcttg gttggatcga ggtggccgca ttggcggctg cctcagtagt cagtgccaag 60

55
 gatgatctcg cgtactcccc tcctttctac ccttccccat gggcagatgg tcagggtgaa 120

tgggcggaag tatacaaacg cgctgtagac atagtttccc agatgacgtt gacagagaaa 180

gtcaacttaa cgactggaac aggatggcaa ctagagaggt gtgttggaca aactggcagt 240

ES 2 594 528 T3

	gttcccagac tcaacatccc cagcttgtgt ttgcaggata gtcctcttgg tattcgtttc	300
	tcggactaca attcagcttt ccctgcgggt gttaatgtcg ctgccacctg ggacaagacg	360
5	ctcgcctacc ttcgtggtca ggcaatgggt gaggagtcca gtgataaggg tattgacgtt	420
	cagctgggtc ctgctgctgg ccctctcggg gctcatccgg atggcggtag aaactgggaa	480
10	ggttttctcac cagatccagc cctcaccggg gtactttttg cggagacgat taagggtatt	540
	caagatgctg gtgtcattgc gacagctaag cattatatca tgaacgaaca agagcatttc	600
	cgccaacaac ccgaggctgc gggttacgga ttcaacgtaa gcgacagttt gagttccaac	660
15	gttgatgaca agactatgca tgaattgtac ctctggccct tcgcggatgc agtacgcgct	720
	ggagtccgtg ctgtcatgtg ctcttacaac caaatcaaca acagctacgg ttgcgagaat	780
20	agcgaaactc tgaacaagct tttgaaggcg gagcttgggt tccaaggctt cgtcatgagt	840
	gattggaccg ctcatcacag cggcgtaggc gctgcttttag caggtctgga tatgtcgatg	900
	cccggatgatg ttaccttcga tagtggtacg tctttctggg gtgcaaactt gacggtcggt	960
25	gtccttaacg gtacaatccc ccaatggcgt gttgatgaca tggctgtccg tatcatggcc	1020
	gcttattaca aggttggccg cgacaccaa tacaccctc ccaacttcag ctctgtggacc	1080
30	agggacgaat atggtttcgc gcataaccat gtttcggaag gtgcttacga gaggggtcaac	1140
	gaattcgtgg acgtgcaacg cgatcatgcc gacctaatcc gtcgcatcgg cgcgcagagc	1200
	actgttctgc tgaagaacaa gggtgcttg cccttgagcc gcaaggaaaa gctggctgcc	1260
35	cttctgggag aggatgcggg ttccaactcg tggggcgcta acggctgtga tgaccgtggt	1320
	tgcgataacg gtacccttgc catggcctgg ggtagcggta ctgcgaattt cccatacctc	1380
40	gtgacaccag agcaggcgat tcagaacgaa gttcttcagg gccgtggtaa tgtcttcgcc	1440
	gtgaccgaca gttgggcgct cgacaagatc gctgcggctg cccgccaggc cagcgtatct	1500
	ctcgtgttcg tcaactccga ctcaggagaa ggctatctta gtgtggatgg aatgagggc	1560
45	gatcgtaaca acatcactct gtggaagaac ggcgacaatg tggtaagac cgcagcgaat	1620
	aactgtaaca acaccgttgt catcatccac tccgtcggac cagttttgat cgatgaatgg	1680
50	tatgaccacc ccaatgtcac tggattctc tgggctggtc tgccaggcca ggagtctggt	1740
	aactccattg ccgatgtgct gtacggctcg gtcaaccctg gcgccaagtc tcctttcact	1800
	tggggcaaga cccgggagtc gtatggttct cccttgggtca aggatgcca caatggcaac	1860
55	ggagcgcccc agtctgattt caccaggggt gttttcatcg attaccgcca tttcgataag	1920
	ttcaatgaga cccctatcta cgagtttggc tacggcttga gctacaccac cttcgagctc	1980
	tccgacctcc atgttcagcc cctgaacgcg tcccgataca ctcccaccag tggcatgact	2040

ES 2 594 528 T3

```

gaagctgcaa agaactttgg tgaaattggc gatgcgctcg agtacgtgta tccggagggg      2100
ctggaaagga tccatgagtt tatctatccc tggatcaact ctaccgacct gaaggcatcg      2160
5  tctgacgatt ctaactacgg ctgggaagac tccaagtata ttcccgaagg cgccacggat      2220
gggtctgccc agccccgttt gcccgctagt ggtggtgccg gaggaacacc cggctctgtac      2280
10 gaggatcttt tccgcgtctc tgtgaaggtc aagaacacgg gcaatgtcgc cggatgatgaa      2340
gttcctcagc tgtacgtttc cctaggcggc ccgaatgagc ccaaggtggt actgcbcaag      2400
tttgagcgta ttcacttggc cccttcgcag gaggccgtgt ggacaacgac ccttaccctg      2460
15 cgtgaccttg caaactggga cgtttcggct caggactgga ccgtcactcc ttacccaag      2520
acgatctacg ttggaaactc ctcacggaaa ctgcccctcc aggccctcgt gcctaaggcc      2580
20 cagtaa      2586

<210> 54
<211> 861
25 <212> PRT
    <213> Aspergillus oryzae

<400> 54
30 Met Lys Leu Gly Trp Ile Glu Val Ala Ala Leu Ala Ala Ala Ser Val
   1           5           10           15

Val Ser Ala Lys Asp Asp Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser
35           20           25           30

Pro Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Glu Val Tyr Lys Arg Ala
40           35           40           45

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

45 Thr Gly Thr Gly Trp Gln Leu Glu Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser
   65           70           75           80

50 Val Pro Arg Leu Asn Ile Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu
           85           90           95

Gly Ile Arg Phe Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Val Asn
55           100          105          110

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

```


ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Pro Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
 595 600 605
 5 Gly Ser Pro Leu Val Lys Asp Ala Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
 610 615 620
 10 Ser Asp Phe Thr Gln Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
 625 630 635 640
 15 Phe Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr
 645 650 655
 20 Thr Phe Glu Leu Ser Asp Leu His Val Gln Pro Leu Asn Ala Ser Arg
 660 665 670
 25 Tyr Thr Pro Thr Ser Gly Met Thr Glu Ala Ala Lys Asn Phe Gly Glu
 675 680 685
 30 His Glu Phe Ile Tyr Pro Trp Ile Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser
 705 710 715 720
 35 Ser Asp Asp Ser Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Lys Tyr Ile Pro Glu
 725 730 735
 40 Gly Ala Thr Asp Gly Ser Ala Gln Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly
 740 745 750
 45 Lys Val Lys Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu
 770 775 780
 50 Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys
 785 790 795 800
 55 Phe Glu Arg Ile His Leu Ala Pro Ser Gln Glu Ala Val Trp Thr Thr
 805 810 815
 Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Ser Ala Gln Asp
 820 825 830

ES 2 594 528 T3

Trp Thr Val Thr Pro Tyr Pro Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser Ser
 835 840 845

5
 Arg Lys Leu Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Lys Ala Gln
 850 855 860

10 <210> 55
 <211> 3060
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus fumigatus*

15 <400> 55
 atgagattcg gttggctcga ggtggccgct ctgacggccg cttctgtagc caatgcccag 60
 gtttgtgatg ctttcccgtc attgtttcgg atatagttga caatagtcac ggaaataatc 120
 20 aggaattggc tttctctcca ccattctacc cttcgccttg ggctgatggc cagggagagt 180
 gggcagatgc ccatcgacgc gccgtcgaga tcgtttctca gatgacactg gcggagaagg 240
 ttaaccttac aacgggtact gggtggttg cgactttttt gttgacagtg agctttcttc 300
 25 actgaccatc tacacagatg ggaaatggac cgatgcgctc gtcaaaccgg cagcgttccc 360
 aggtaagctt gcaattctgc aacaacgtgc aagtgtagtt gctaaaacgc ggtggtgcag 420
 30 acttggatc aactggggtc tttgtggcca ggattcccct ttgggtatcc gtttctgtga 480
 gctatacccg cggagtcttt cagtccttgt attatgtgct gatgattgtc tctgtatagc 540
 tgacctcaac tccgccttcc ctgctggtac taatgtcgcc gcgacatggg acaagacact 600
 35 cgcctacctt cgtggcaagg ccatgggtga ggaattcaac gacaagggcg tggacatttt 660
 gctggggcct gctgctggtc ctctcggcaa ataccggac ggcggcagaa tctgggaagg 720
 40 cttctctcct gatccggttc tcaactggtg acttttcgcc gaaactatca agggatcca 780
 agacgcgggt gtgattgcta ctgccaagca ttacattctg aatgaacagg agcatttccg 840
 acaggttggc gaggcccagg gatatggta caacatcacg gagacgatca gctccaacgt 900
 45 ggatgacaag accatgcacg agttgtacct ttggtgagta gttgacactg caaatgagga 960
 ccttgattga tttgactgac ctggaatgca ggccctttgc agatgctgtg cgcggtaaga 1020
 50 ttttccgtag acttgacctc gcgacgaaga aatcgctgac gaaccatcgt agctggcgtt 1080
 ggcgctgtca tgtgttctca caatcaaate aacaacagct acggttgcata aacagtcaa 1140
 actctcaaca agctcctcaa ggctgagctg ggcttccaag gcttcgtcat gagtgactgg 1200
 55 agcgctcacc acagcgggtg cggcgctgcc ctcgctgggt tggatatgtc gatgcctgga 1260
 gacatttcct tcgacgacgg actctccttc tggggcacga acctaactgt cagtgttctt 1320

ES 2 594 528 T3

	aacggcaccg	ttccagcctg	gcgtgtcgat	gacatggctg	ttcgtatcat	gaccgcgtac	1380
	tacaagggtg	gtcgtgaccg	tcttcgtatt	ccccctaact	tcagctcctg	gacccgggat	1440
5	gagtacggct	gggagcattc	tgetgtctcc	gagggagcct	ggaccaagggt	gaacgacttc	1500
	gtcaatgtgc	agcgcagtca	ctctcagatc	atccgtgaga	ttggtgccgc	tagtacagtg	1560
	ctcttgaaga	acacgggtgc	tcttcctttg	accggcaagg	aggttaaagt	gggtgttctc	1620
10	ggtgaagacg	ctggttccaa	cccgtggggg	gctaacggct	gccccgaccg	cggctgtgat	1680
	aacggcactc	ttgctatggc	ctggggtagt	ggtactgcca	acttccctta	ccttgtcacc	1740
15	cccgagcagg	ctatccagcg	agaggtcatc	agcaacggcg	gcaatgtctt	tgetgtgact	1800
	gataacgggg	ctctcagcca	gatggcagat	gttgcatctc	aatccagggtg	agtgcgggct	1860
	cttagaaaaa	gaacgttctc	tgaatgaagt	tttttaacca	ttgcgaacag	cgtgtctttg	1920
20	gtgtttgtca	acgccgactc	tggagagggt	ttcatcagtg	tcgacggcaa	cgagggtgac	1980
	cgcaaaaatc	tactctgtg	gaagaacggc	gaggccgtca	ttgacactgt	tgtcagccac	2040
25	tgcaacaaca	cgattgtggt	tattcacagt	gttgggcccg	tcttgatcga	ccggtggtat	2100
	gataacccca	acgtcactgc	catcatctgg	gccggcttgc	ccggtcagga	gagtggcaac	2160
	tccctggtcg	acgtgctcta	tggccgcgtc	aaccccagcg	ccaagacccc	gttcacctgg	2220
30	ggcaagactc	gggagtctta	cggggctccc	ttgctcaccg	agcctaacia	tggcaatggt	2280
	gctccccagg	atgatttcaa	cgagggcgtc	ttcattgact	accgtcactt	tgacaagcgc	2340
35	aatgagaccc	ccatttatga	gtttggccat	ggcttgagct	acaccacctt	tggttactct	2400
	caccttcggg	ttcaggccct	caatagtctg	agttcggcat	atgtcccgac	tagcggagag	2460
	accaagcctg	cgccaaccta	tggtgagatc	ggtagtgccg	ccgactacct	gtatcccgag	2520
40	ggtctcaaaa	gaattaccaa	gtttatttac	ccttggctca	actcgaccga	cctcgaggat	2580
	tcttctgacg	accgaacta	cggctgggag	gactcggagt	acattcccga	aggcgctagg	2640
45	gatgggtctc	ctcaaccctt	cctgaaggct	ggcggcgctc	ctggtggtaa	ccctaccctt	2700
	tatcaggatc	ttgttagggt	gtcggccacc	ataaccaaca	ctggtaacgt	cgccggttat	2760
	gaagtccctc	aattggtgag	tgacccgcat	gttccttgcg	ttgcaatttg	gctaactcgc	2820
50	ttctagtatg	tttactggg	cggaccgaac	gagcctcggg	tcgttctgcg	caagttcgac	2880
	cgaatcttcc	tggctcctgg	ggagcaaaag	gtttggacca	cgactcttaa	ccgtcgtgat	2940
55	ctcgccaatt	gggatgtgga	ggctcaggac	tgggtcatca	caaagtaccc	caagaaagtg	3000
	cacgtcggca	gctcctcgcg	taagctgcct	ctgagagcgc	ctctgccccg	tgtctactag	3060

ES 2 594 528 T3

<210> 56
 <211> 863
 <212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus

5

<400> 56

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
450 455 460

5
Gln Ala Ile Gln Arg Glu Val Ile Ser Asn Gly Gly Asn Val Phe Ala
465 470 475 480

10
Val Thr Asp Asn Gly Ala Leu Ser Gln Met Ala Asp Val Ala Ser Gln
485 490 495

15
Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Phe
500 505 510

20
Ile Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Lys Asn Leu Thr Leu Trp
515 520 525

Lys Asn Gly Glu Ala Val Ile Asp Thr Val Val Ser His Cys Asn Asn
530 535 540

25
Thr Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Arg Trp
545 550 555 560

30
Tyr Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Ile Trp Ala Gly Leu Pro Gly
565 570 575

35
Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
580 585 590

40
Pro Ser Ala Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
595 600 605

Gly Ala Pro Leu Leu Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
610 615 620

45
Asp Asp Phe Asn Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
625 630 635 640

50
Arg Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr
645 650 655

55
Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser
660 665 670

Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr
675 680 685

ES 2 594 528 T3

5 Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys
 690 695 700
 Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu
 705 710 715 720
 10 Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile
 725 730 735
 15 Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly
 740 745 750
 20 Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val
 755 760 765
 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro
 770 775 780
 25 Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
 785 790 795 800
 30 Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
 805 810 815
 35 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
 820 825 830
 40 Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
 835 840 845
 45 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
 850 855 860

<210> 57
 <211> 2800
 <212> ADN
 50 <213> Penicillium brasilianum

<400> 57
 tgaaaatgca gggttctaca atctttctgg ctttcgcctc atgggcgagc caggttgctg 60
 55 ccattgcgca gccatacag aagcacgagg tttgttttat cttgctcatg gacgtgcttt 120
 gacttgacta attgttttac atacagcccg gattttctgca cgggccccaa gccatagaat 180
 cgttctcaga accgtttctac ccgtcgcctt ggatgaatcc tcacgccgag ggctgggagg 240

ES 2 594 528 T3

	ccgcatatca	gaaagctcaa	gattttgtct	cgcaactcac	tatcttgag	aaaataaatc	300
	tgaccaccgg	tgttgggtaa	gtctctccga	ctgcttctgg	gtcacggg	gacgagccac	360
5	tgactttttg	aagctgggaa	aatgggccgt	gtgtaggaaa	cactggatca	attcctcgtc	420
	tcggattcaa	aggattttgt	accagagatt	caccacaggg	tgttcggttc	gcagattatt	480
10	cctccgcttt	cacatctagc	caaatggccg	ccgcaacatt	tgaccgctca	attctttatc	540
	aacgaggcca	agccatggca	caggaacaca	aggctaaggg	tatcacaatt	caattgggcc	600
	ctggtgccgg	ccctctcggt	cgcatccccg	agggcggccg	caactgggaa	ggattctccc	660
15	ctgatcctgt	cttgactggt	atagccatgg	ctgagacaat	taagggcatg	caggatactg	720
	gagtgattgc	ttgcgctaaa	cattatattg	gaaacgagca	ggagcacttc	cgtaagtgg	780
20	gtgaagctgc	gggtcacgga	tacactat	ccgatactat	ttcatcta	attgacgacc	840
	gtgctatgca	tgagctatac	ttgtggccat	ttgctgatgc	cgttcgcgct	ggtgtgggtt	900
	ctttcatgtg	ctcactctct	cagatcaaca	actcctacgg	atgccaaaac	agtcagaccc	960
25	tcaacaagct	cctcaagagc	gaattgggct	tccaaggctt	tgtcatgagc	gattgggggtg	1020
	cccatcactc	tggagtgtca	tcggcgctag	ctggacttga	tatgagcatg	ccgggtgata	1080
30	ccgaatttga	ttctggcttg	agcttctggg	gctctaacct	caccattgca	attctgaacg	1140
	gcacggttcc	cgaatggcgc	ctggatgaca	tggcgatg	aattatggct	gcatacttca	1200
	aagttggcct	tactattgag	gatcaaccag	atgtcaactt	caatgcctgg	acccatgaca	1260
35	cctacggata	taaatacgct	tatagcaagg	aagattacga	gcagggtcaac	tggcatgtcg	1320
	atgttcgcag	cgaccacaat	aagctcattc	gcgagactgc	cgcaagggtt	acagttctgc	1380
40	tgaagaacaa	ctttcatgct	ctccctctga	agcagcccag	gttcgtggcc	gtcgttggtc	1440
	aggatgccgg	gcaaacc	aagggcccta	acggctg	agaccgagga	tgcgaccaag	1500
	gcactctcgc	aatgggatg	ggctcagggt	ctaccgaatt	cccttacctg	gtcactcctg	1560
45	acactgctat	tcagtcaaag	gtcctcgaat	acgggggtcg	atacgagagt	atTTTTgata	1620
	actatgacga	caatgctatc	ttgtcgcttg	tctcacagcc	tgatgcaacc	tgtatcgttt	1680
50	ttgcaaatgc	cgattccggt	gaaggctaca	tactgtcga	caacaactgg	ggtgaccgca	1740
	acaatctgac	cctctggcaa	aatgccgatc	aagtgattag	cactgtcagc	tcgcatgca	1800
	acaacacaat	cgttgttctc	cactctgtcg	gaccagtgtt	gctaaatggt	atatatgagc	1860
55	acccgaacat	cacagctatt	gtctgggcag	ggatgccag	cgaagaatct	ggcaatgctc	1920
	tcgtggatat	tctttggggc	aatgttaacc	ctgccggtcg	cactccgttc	acctgggcca	1980

ES 2 594 528 T3

aaagtcgaga ggactatggc actgatataa tgtacgagcc caacaacggc cagcgtgcgc 2040
 ctacgacagga tttcaccgag agcatctacc tcgactaccg ccatttcgac aaagctggta 2100
 5 tcgagccaat ttacgagttt ggattcggcc tctcctatac caccttcgaa tactctgacc 2160
 tccgtgttgt gaagaagtat gttcaacat acagtcccac gaccggcacc ggtgctcaag 2220
 caccttccat cggacagcca cctagccaga acctggatac ctacaagttc cctgctacat 2280
 10 acaagtacat caaaccttc atttatccct acctgaacag cactgtctcc ctccgcgctg 2340
 cttccaagga tcccgaatac ggctgtacag actttatccc accccacgcg cgtgatggct 2400
 15 cccctcaacc tctcaacccc gctggagacc cagtggccag tggtggaac aacatgctct 2460
 acgacgaact ttacgaggtc actgcacaga tcaaaaacac tggcgacgtg gccggcgacg 2520
 aagtcgtcca gctttacgta gatctcgggg gtgacaaccc gcctcgtcag ttgagaaact 2580
 20 ttgacaggtt ttatctgctg cccggtcaga gctcaacatt ccgggctaca ttgacgcgcc 2640
 gtgatttgag caactgggat attgaggcgc agaactggcg agttacggaa tcgcctaaga 2700
 25 gagtgtatgt tggacggtcg agtcgggatt tgccgctgag ctacaattg gagtaatgat 2760
 catgtctacc aatagatggt gaatgtctgg tgtggatatt 2800

30 <210> 58
 <211> 878
 <212> PRT
 <213> *Penicillium brasilianum*

35 <400> 58

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

ES 2 594 528 T3

Ser Ile Pro Arg Leu Gly Phe Lys Gly Phe Cys Thr Gln Asp Ser Pro
100 105 110

5
Gln Gly Val Arg Phe Ala Asp Tyr Ser Ser Ala Phe Thr Ser Ser Gln
115 120 125

10
Met Ala Ala Ala Thr Phe Asp Arg Ser Ile Leu Tyr Gln Arg Gly Gln
130 135 140

15
Ala Met Ala Gln Glu His Lys Ala Lys Gly Ile Thr Ile Gln Leu Gly
145 150 155 160

20
Pro Val Ala Gly Pro Leu Gly Arg Ile Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp
165 170 175

25
Glu Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Ile Ala Met Ala Glu
180 185 190

30
Thr Ile Lys Gly Met Gln Asp Thr Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His
195 200 205

35
Tyr Ile Gly Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Val Gly Glu Ala Ala
210 215 220

40
Gly His Gly Tyr Thr Ile Ser Asp Thr Ile Ser Ser Asn Ile Asp Asp
225 230 235 240

45
Arg Ala Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg
245 250 255

50
Ala Gly Val Gly Ser Phe Met Cys Ser Tyr Ser Gln Ile Asn Asn Ser
260 265 270

55
Tyr Gly Cys Gln Asn Ser Gln Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ser Glu
275 280 285

60
Leu Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Gly Ala His His Ser
290 295 300

65
Gly Val Ser Ser Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp
305 310 315 320

70
Thr Glu Phe Asp Ser Gly Leu Ser Phe Trp Gly Ser Asn Leu Thr Ile
325 330 335

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

	565					570					575					
5	Gly	Ile	Tyr	Glu	His	Pro	Asn	Ile	Thr	Ala	Ile	Val	Trp	Ala	Gly	Met
				580					585					590		
10	Pro	Gly	Glu	Glu	Ser	Gly	Asn	Ala	Leu	Val	Asp	Ile	Leu	Trp	Gly	Asn
			595					600					605			
15	Val	Asn	Pro	Ala	Gly	Arg	Thr	Pro	Phe	Thr	Trp	Ala	Lys	Ser	Arg	Glu
		610					615					620				
20	Asp	Tyr	Gly	Thr	Asp	Ile	Met	Tyr	Glu	Pro	Asn	Asn	Gly	Gln	Arg	Ala
	625					630					635					640
25	Pro	Gln	Gln	Asp	Phe	Thr	Glu	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asp	Tyr	Arg	His	Phe
					645					650					655	
30	Asp	Lys	Ala	Gly	Ile	Glu	Pro	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	Phe	Gly	Leu	Ser
				660					665					670		
35	Tyr	Thr	Thr	Phe	Glu	Tyr	Ser	Asp	Leu	Arg	Val	Val	Lys	Lys	Tyr	Val
			675					680					685			
40	Gln	Pro	Tyr	Ser	Pro	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Ala	Gln	Ala	Pro	Ser	Ile
		690					695					700				
45	Gly	Gln	Pro	Pro	Ser	Gln	Asn	Leu	Asp	Thr	Tyr	Lys	Phe	Pro	Ala	Thr
	705					710					715					720
50	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Lys	Thr	Phe	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Asn	Ser	Thr	Val
					725					730					735	
55	Ser	Leu	Arg	Ala	Ala	Ser	Lys	Asp	Pro	Glu	Tyr	Gly	Arg	Thr	Asp	Phe
				740					745					750		
60	Ile	Pro	Pro	His	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Pro	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ala
			755					760					765			
65	Gly	Asp	Pro	Val	Ala	Ser	Gly	Gly	Asn	Asn	Met	Leu	Tyr	Asp	Glu	Leu
		770					775					780				
70	Tyr	Glu	Val	Thr	Ala	Gln	Ile	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Gly	Asp
	785					790					795					800

ES 2 594 528 T3

Glu Val Val Gln Leu Tyr Val Asp Leu Gly Gly Asp Asn Pro Pro Arg
805 810 815

5 Gln Leu Arg Asn Phe Asp Arg Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Gln Ser Ser
820 825 830

10 Thr Phe Arg Ala Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Ile
835 840 845

15 Glu Ala Gln Asn Trp Arg Val Thr Glu Ser Pro Lys Arg Val Tyr Val
850 855 860

20 Gly Arg Ser Ser Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ser Gln Leu Glu
865 870 875

<210> 59
<211> 2583
<212> ADN
<213> Aspergillus niger

25 <400> 59

atgagggttca ctttgatcga ggcggtggct ctgactgccg tctcgctggc cagcgctgat 60

gaattggcct actccccacc gtattacca tccccttggg ccaatggcca gggcgactgg 120

30 gcgcagggcat accagcgcgc tgttgatatt gtctcgcaaa tgacattgga tgagaaggtc 180

aatctgacca caggaactgg atgggaattg gaactatgtg ttggtcagac tggcgggtgtt 240

35 ccccgattgg gagttccggg aatgtgttta caggatagcc ctctgggcgt tcgcgactcc 300

gactacaact ctgctttccc tgccggcatg aacgtggctg caacctggga caagaatctg 360

40 gcataccttc gcggcaaggc tatgggtcag gaatttagtg acaagggtgc cgatatccaa 420

ttgggtccag ctgccggccc tctcggtaga agtcccgcgc gtggtcgtaa ctgggagggc 480

ttctccccag accctgccct aagtgggtgtg ctctttgccg agaccatcaa gggatatccaa 540

45 gatgctgggtg tggttgcgac ggctaagcac tacattgctt acgagcaaga gcatttccgt 600

caggcgcctg aagcccaagg ttttggattt aatatttccg agagtggaag tgccaacctc 660

gatgataaga ctatgcacga gctgtacctc tggcccttcg cggatgccat ccgtgcaggt 720

50 gctggcgctg tgatgtgctc ctacaaccag atcaacaaca gttatggctg ccagaacagc 780

tacactctga acaagctgct caaggccgag ctgggcttcc agggtttgt catgagtgat 840

55 tgggctgctc accatgctgg tgtgagtggg gctttggcag gattggatat gtctatgcca 900

ggagacgtcg actacgacag tggtagctct tactggggta caaacttgac cattagcgtg 960

ctcaacggaa cggtgcccca atggcgtgtt gatgacatgg ctgtccgcat catggccgcc 1020

ES 2 594 528 T3

	tactacaag	tcggccgtga	ccgtctgtgg	actcctccca	acttcagctc	atggaccaga	1080
	gatgaatacg	gctacaagta	ctactacgtg	tcggaggggac	cgtagagaaa	ggtaaccag	1140
5	tacgtgaatg	tgcaacgcaa	ccacagcgaa	ctgattcgcc	gcattggagc	ggacagcacg	1200
	gtgctcctca	agaacgacgg	cgctctgcct	ttgactggta	aggagcgctt	ggtcgcgctt	1260
10	atcggagaag	atgcgggctc	caacccttat	ggtgccaacg	gctgcagtga	ccgtggatgc	1320
	gacaatggaa	cattggcgat	gggctgggga	agtggactg	ccaacttccc	atacctggtg	1380
	acccccgagc	aggccatctc	aaacgaggtg	cttaagcaca	agaatgggtg	attcaccgcc	1440
15	accgataact	gggctatcga	tcagattgag	gcgcttgcta	agaccgccag	tgtctctctt	1500
	gtctttgtca	acgccgactc	tggtgaggg	tacatcaatg	tggacggaaa	cctgggtgac	1560
20	cgcaggaacc	tgaccctgtg	gaggaacggc	gataatgtga	tcaaggctgc	tgctagcaac	1620
	tgcaacaaca	caatcgttgt	cattcactct	gtcggaccag	tcttggttaa	cgagtggtag	1680
	gacaacccca	atgttaccgc	tatcctctgg	ggtggtttgc	ccggtcagga	gtctggcaac	1740
25	tctcttgccg	acgtcctcta	tggccgtgtc	aacccccgtg	ccaagtcgcc	ctttacctgg	1800
	ggcaagactc	gtgaggccta	ccaagactac	ttggtcaccg	agccaacaaa	cggcaacgga	1860
30	gcccctcagg	aagactttgt	cgagggcgtc	ttcattgact	accgtggatt	tgacaagcgc	1920
	aacgagaccc	cgatctacga	gttcggctat	ggtctgagct	acaccacttt	caactactcg	1980
	aaccttgagg	tgcaggtgct	gagcgcacct	gcatacgagc	ctgcttcggg	tgagaccgag	2040
35	gcagcgccaa	ccttcggaga	ggttgaaaat	gcgtcggatt	acctctaccc	cagcggattg	2100
	cagagaatta	ccaagttcat	ctaccctgg	ctcaacggta	ccgatctcga	ggcatcttcc	2160
40	ggggatgcta	gctacgggca	ggactcctcc	gactatcttc	ccgagggagc	caccgatggc	2220
	tctgcgcaac	cgatcctgcc	tgccggtggc	ggtcctggcg	gcaaccctcg	cctgtacgac	2280
	gagctcatcc	gcgtgtcagt	gaccatcaag	aacaccggca	aggttgctgg	tgatgaagtt	2340
45	ccccaaactgt	atgtttccct	tggcgggtccc	aatgagccca	agatcgtgct	gcgtcaattc	2400
	gagcgcacatca	cgctgcagcc	gtcggaggag	acgaagtgga	gcacgactct	gacgcgccgt	2460
50	gaccttgcaa	actggaatgt	tgagaagcag	gactgggaga	ttacgtcgta	tcccaagatg	2520
	gtgtttgtcg	gaagctcctc	gcggaagctg	ccgctccggg	cgtctctgcc	tactgttcac	2580
55	taa						2583
	<210>	60					
	<211>	860					
	<212>	PRT					

ES 2 594 528 T3

<213> Aspergillus niger

<400> 60

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

10 Ala Ser Ala Asp Glu Leu Ala Tyr Ser Pro Pro Tyr Tyr Pro Ser Pro
 20 25 30

15 Trp Ala Asn Gly Gln Gly Asp Trp Ala Gln Ala Tyr Gln Arg Ala Val
 35 40 45

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

25 Gly Thr Gly Trp Glu Leu Glu Leu Cys Val Gly Gln Thr Gly Gly Val
 65 70 75 80

30 Pro Arg Leu Gly Val Pro Gly Met Cys Leu Gln Asp Ser Pro Leu Gly
 85 90 95

35 Val Arg Asp Ser Asp Tyr Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Met Asn Val
 100 105 110

40 Ala Ala Thr Trp Asp Lys Asn Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Lys Ala Met
 115 120 125

45 Gly Gln Glu Phe Ser Asp Lys Gly Ala Asp Ile Gln Leu Gly Pro Ala
 130 135 140

50 Ala Gly Pro Leu Gly Arg Ser Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly
 145 150 155 160

55 Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu Ser Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr Ile
 165 170 175

60 Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Val Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile
 180 185 190

65 Ala Tyr Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Ala Pro Glu Ala Gln Gly Phe
 195 200 205

70 Gly Phe Asn Ile Ser Glu Ser Gly Ser Ala Asn Leu Asp Asp Lys Thr
 210 215 220

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

5 Ala Ile Ser Asn Glu Val Leu Lys His Lys Asn Gly Val Phe Thr Ala
 465 470 475 480
 Thr Asp Asn Trp Ala Ile Asp Gln Ile Glu Ala Leu Ala Lys Thr Ala
 485 490 495
 10 Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile
 500 505 510
 15 Asn Val Asp Gly Asn Leu Gly Asp Arg Arg Asn Leu Thr Leu Trp Arg
 515 520 525
 20 Asn Gly Asp Asn Val Ile Lys Ala Ala Ala Ser Asn Cys Asn Asn Thr
 530 535 540
 25 Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Val Asn Glu Trp Tyr
 545 550 555 560
 Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Leu Trp Gly Gly Leu Pro Gly Gln
 565 570 575
 30 Glu Ser Gly Asn Ser Leu Ala Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn Pro
 580 585 590
 35 Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ala Tyr Gln
 595 600 605
 40 Asp Tyr Leu Val Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln Glu
 610 615 620
 45 Asp Phe Val Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg Gly Phe Asp Lys Arg
 625 630 635 640
 Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr Thr
 645 650 655
 50 Phe Asn Tyr Ser Asn Leu Glu Val Gln Val Leu Ser Ala Pro Ala Tyr
 660 665 670
 55 Glu Pro Ala Ser Gly Glu Thr Glu Ala Ala Pro Thr Phe Gly Glu Val
 675 680 685
 Gly Asn Ala Ser Asp Tyr Leu Tyr Pro Ser Gly Leu Gln Arg Ile Thr

ES 2 594 528 T3

	690		695		700															
5	Lys	Phe	Ile	Tyr	Pro	Trp	Leu	Asn	Gly	Thr	Asp	Leu	Glu	Ala	Ser	Ser				
	705					710					715					720				
10	Gly	Asp	Ala	Ser	Tyr	Gly	Gln	Asp	Ser	Ser	Asp	Tyr	Leu	Pro	Glu	Gly				
					725						730				735					
15	Ala	Thr	Asp	Gly	Ser	Ala	Gln	Pro	Ile	Leu	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Pro				
				740					745					750						
20	Gly	Gly	Asn	Pro	Arg	Leu	Tyr	Asp	Glu	Leu	Ile	Arg	Val	Ser	Val	Thr				
			755					760					765							
25	Ile	Lys	Asn	Thr	Gly	Lys	Val	Ala	Gly	Asp	Glu	Val	Pro	Gln	Leu	Tyr				
		770					775						780							
30	Val	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro	Asn	Glu	Pro	Lys	Ile	Val	Leu	Arg	Gln	Phe				
	785					790					795					800				
35	Glu	Arg	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Ser	Glu	Glu	Thr	Lys	Trp	Ser	Thr	Thr				
					805					810					815					
40	Leu	Thr	Arg	Arg	Asp	Leu	Ala	Asn	Trp	Asn	Val	Glu	Lys	Gln	Asp	Trp				
				820					825					830						
45	Glu	Ile	Thr	Ser	Tyr	Pro	Lys	Met	Val	Phe	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Arg				
			835					840					845							
50	Lys	Leu	Pro	Leu	Arg	Ala	Ser	Leu	Pro	Thr	Val	His								
		850					855					860								
55	<210>	61																		
	<211>	2583																		
	<212>	ADN																		
	<213>	Aspergillus aculeatus																		
60	<400>	61																		
	atgaagctca	gttggcttga	ggcggctgcc	ttgacggctg	cttcagtcgt	cagcgctgat														60
	gaactggcgt	tctctcctcc	tttctacccc	tctccgtggg	ccaatggcca	gggagagtgg														120
	gcggaagcct	accagcgtgc	agtggccatt	gtatcccaga	tgactctgga	tgagaaggtc														180
	aacctgacca	ccggaactgg	atgggagctg	gagaagtgcg	tcggtcagac	tggtggtgtc														240
	ccaagactga	acatcgggtg	catgtgtctt	caggacagtc	ccttgggaat	tcgtgatagt														300

ES 2 594 528 T3

	gactacaatt	cggtttccc	tgctggtgtc	aacgttgctg	cgacatggga	caagaacctt	360
	gcttatctac	gtggtcaggc	tatgggtcaa	gagttcagtg	acaaggaat	tgatgttcaa	420
5	ttgggaccgg	ccgcgggtcc	cctcggcagg	agccctgatg	gaggtcgcaa	ctgggaaggt	480
	ttctctccag	acccggctct	tactggtgtg	ctctttgctg	agacgattaa	gggtattcaa	540
	gacgctggtg	tcgtggcgac	agccaagcat	tacattctca	atgagcaaga	gcattttccgc	600
10	caggtcgcag	aggctgcggg	ctacggattc	aatatctccg	acacgatcag	ctctaactgt	660
	gatgacaaga	ccattcatga	aatgtacctc	tggcccttcg	cggatgccgt	tcgcgccggc	720
15	gttggcgcca	tcatgtgttc	ctacaaccag	atcaacaaca	gctacggttg	ccagaacagt	780
	tacactctga	acaagcttct	gaaggccgag	ctcggcttcc	agggctttgt	gatgtctgac	840
	tggggtgctc	accacagtgg	tgttggctct	gctttggccg	gcttgatat	gtcaatgcct	900
20	ggcgatatca	ccttcgattc	tgccactagt	ttctggggta	ccaacctgac	cattgctgtg	960
	ctcaacggta	ccgtcccgca	gtggcgcgct	gacgacatgg	ctgtccgtat	catggctgcc	1020
25	tactacaagg	ttggccgcca	ccgcctgtac	cagccgccta	acttcagctc	ctggactcgc	1080
	gatgaatacg	gcttcaagta	tttctacccc	caggaagggc	cctatgagaa	ggtcaatcac	1140
	tttgtcaatg	tgcagcgcaa	ccacagcgag	gttattcgca	agttgggagc	agacagtact	1200
30	gttctactga	agaacaacaa	tgccctgccc	ctgaccggaa	aggagcgcaa	agttgcgatc	1260
	ctgggtgaag	atgctggatc	caactcgtac	ggtgccaatg	gctgctctga	ccgtggctgt	1320
35	gacaacggta	ctcttgctat	ggcttggggg	agcggcactg	ccgaattccc	atatctcgtg	1380
	accctgagc	aggctattca	agccgaggtg	ctcaagcata	agggcagcgt	ctacgccatc	1440
	acggacaact	gggcgctgag	ccagggtggag	accctcgccta	acaagccag	tgtctctctt	1500
40	gtatthgtca	actcggacgc	gggagagggc	tatatctccg	tggacggaaa	cgagggcgac	1560
	cgcaacaacc	tcaccctctg	gaagaacggc	gacaacctca	tcaaggctgc	tgcaaacac	1620
45	tgcaacaaca	ccatcgttgt	catccactcc	gttggacctg	ttttggttga	cgagtggat	1680
	gaccacccca	acgttactgc	catcctctgg	gcgggcttgc	ctggccagga	gtctggcaac	1740
	tccttggctg	acgtgctcta	cggccgcgct	aaccggggcg	ccaaatctcc	attcacctgg	1800
50	ggcaagacga	gggagcgta	cggggattac	cttgtccgtg	agctcaacaa	cggcaacgga	1860
	gctccccaa	atgatttctc	ggaaggtggt	ttcattgact	accgcggatt	cgacaagcgc	1920
55	aatgagaccc	cgatctacga	gttcggacat	ggtctgagct	acaccacttt	caactactct	1980
	ggccttcaca	tccaggttct	caacgcttcc	tccaacgctc	aagtagccac	tgagactggc	2040
	gccgctccca	ccttcggaca	agtcggcaat	gcctctgact	acgtgtacce	tgagggattg	2100

ES 2 594 528 T3

```

accagaatca gcaagttcat ctatccctgg cttaattcca cagacctgaa ggcctcatct      2160
ggcgacctcg actatggagt cgacaccgcg gagcacgtgc cggaggggtgc tactgatggc      2220
5  tctccgcagc ccgttctgcc tgccgggtggt ggctctgggtg gtaaccgcg cctctacgat      2280
gagttgatcc gtgtttcggg gacagtcaag aacctgggtc gtgttgccgg tgatgctgtg      2340
10 cctcaattgt atgtttccct tgggtggacc aatgagccca aggttgtggt gcgcaaattc      2400
gaccgcctca ccctcaagcc ctccgaggag acgggtgtgga cgactaccct gaccgcggcg      2460
15 gatctgtcta actgggacgt tgcggctcag gactgggtca tcacttctta cccgaagaag      2520
gtccatggtg gtagctcttc gcgtcagctg ccccttcacg cggcgctccc gaagggtgcaa      2580
tga                                                                           2583

20
<210> 62
<211> 860
<212> PRT
<213> Aspergillus aculeatus
25
<400> 62

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

```

ES 2 594 528 T3

Gly Gln Glu Phe Ser Asp Lys Gly Ile Asp Val Gln Leu Gly Pro Ala
 130 135 140

5 Ala Gly Pro Leu Gly Arg Ser Pro Asp Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly
 145 150 155 160

10 Phe Ser Pro Asp Pro Ala Leu Thr Gly Val Leu Phe Ala Glu Thr Ile
 165 170 175

15 Lys Gly Ile Gln Asp Ala Gly Val Val Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile
 180 185 190

20 Leu Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Val Ala Glu Ala Ala Gly Tyr
 195 200 205

25 Gly Phe Asn Ile Ser Asp Thr Ile Ser Ser Asn Val Asp Asp Lys Thr
 210 215 220

30 Ile His Glu Met Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg Ala Gly
 225 230 235 240

35 Val Gly Ala Ile Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly
 245 250 255

40 Cys Gln Asn Ser Tyr Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu Gly
 260 265 270

45 Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Gly Ala His His Ser Gly Val
 275 280 285

50 Gly Ser Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Ile Thr
 290 295 300

55 Phe Asp Ser Ala Thr Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Ile Ala Val
 305 310 315 320

60 Leu Asn Gly Thr Val Pro Gln Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val Arg
 325 330 335

65 Ile Met Ala Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Leu Tyr Gln Pro
 340 345 350

70 Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Phe Lys Tyr Phe
 355 360 365

ES 2 594 528 T3

Tyr Pro Gln Glu Gly Pro Tyr Glu Lys Val Asn His Phe Val Asn Val
 370 375 380
 5
 Gln Arg Asn His Ser Glu Val Ile Arg Lys Leu Gly Ala Asp Ser Thr
 385 390 395 400
 10
 Val Leu Leu Lys Asn Asn Asn Ala Leu Pro Leu Thr Gly Lys Glu Arg
 405 410 415
 15
 Lys Val Ala Ile Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Ser Tyr Gly Ala
 420 425 430
 20
 Asn Gly Cys Ser Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala
 435 440 445
 25
 Trp Gly Ser Gly Thr Ala Glu Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln
 450 455 460
 30
 Ala Ile Gln Ala Glu Val Leu Lys His Lys Gly Ser Val Tyr Ala Ile
 465 470 475 480
 35
 Thr Asp Asn Trp Ala Leu Ser Gln Val Glu Thr Leu Ala Lys Gln Ala
 485 490 495
 40
 Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ser Asp Ala Gly Glu Gly Tyr Ile
 500 505 510
 45
 Ser Val Asp Gly Asn Glu Gly Asp Arg Asn Asn Leu Thr Leu Trp Lys
 515 520 525
 50
 Asn Gly Asp Asn Leu Ile Lys Ala Ala Ala Asn Asn Cys Asn Asn Thr
 530 535 540
 55
 Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Val Asp Glu Trp Tyr
 545 550 555 560
 60
 Asp His Pro Asn Val Thr Ala Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln
 565 570 575
 65
 Glu Ser Gly Asn Ser Leu Ala Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn Pro
 580 585 590
 70
 Gly Ala Lys Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ala Tyr Gly
 595 600 605

ES 2 594 528 T3

Asp Tyr Leu Val Arg Glu Leu Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln Asp
 610 615 620
 5
 Asp Phe Ser Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg Gly Phe Asp Lys Arg
 625 630 635 640
 10
 Asn Glu Thr Pro Ile Tyr Glu Phe Gly His Gly Leu Ser Tyr Thr Thr
 645 650 655
 15
 Phe Asn Tyr Ser Gly Leu His Ile Gln Val Leu Asn Ala Ser Ser Asn
 660 665 670
 20
 Ala Gln Val Ala Thr Glu Thr Gly Ala Ala Pro Thr Phe Gly Gln Val
 675 680 685
 25
 Gly Asn Ala Ser Asp Tyr Val Tyr Pro Glu Gly Leu Thr Arg Ile Ser
 690 695 700
 30
 Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser Ser
 705 710 715 720
 35
 Gly Asp Pro Tyr Tyr Gly Val Asp Thr Ala Glu His Val Pro Glu Gly
 725 730 735
 40
 Ala Thr Asp Gly Ser Pro Gln Pro Val Leu Pro Ala Gly Gly Gly Ser
 740 745 750
 45
 Gly Gly Asn Pro Arg Leu Tyr Asp Glu Leu Ile Arg Val Ser Val Thr
 755 760 765
 Val Lys Asn Thr Gly Arg Val Ala Gly Asp Ala Val Pro Gln Leu Tyr
 770 775 780
 50
 Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys Phe
 785 790 795 800
 55
 Asp Arg Leu Thr Leu Lys Pro Ser Glu Glu Thr Val Trp Thr Thr Thr
 805 810 815
 Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Val Ala Ala Gln Asp Trp
 820 825 830
 Val Ile Thr Ser Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser Ser Ser Arg

ES 2 594 528 T3

	835	840	845	
5	Gln Leu Pro Leu His Ala Ala Leu Pro Lys Val Gln			
	850	855	860	
	<210> 63			
	<211> 3294			
10	<212> ADN			
	<213> <i>Aspergillus oryzae</i>			
	<400> 63			
15	atgcgttcct cccccctcct ccgctccgcc gttgtggccg cctgcccgtt gttggccctt			60
	gccgctgatg gcaggccac ccgctactgg gactgctgca agccttcgtg cggctgggcc			120
	aagaaggctc ccgtgaacca gcctgtcttt tcctgcaacg ccaacttcca gcgtatcacg			180
20	gacttcgacg ccaagtccgg ctgcgagccg ggcggtgtcg cctactcgtg cgccgaccag			240
	accccatggg ctgtgaacga cgacttcgag ctcggttttg ctgccacctc tattgccggc			300
	agcaatgagg cgggctggtg ctgcgctgc tacgagctca cttcacatc cggctcctgtt			360
25	gctggcaaga agatggtcgt ccagtccacc agcactggcg gtgatcttgg cagcaaccac			420
	ttcgatctca acatccccgg cggcggcgtc ggcactctcg acggatgcac tccccagttc			480
30	ggtggtctgc ccggccagcg ctacggcggc atctcgtccc gcaacgagtg cgatcggttc			540
	cccgaacccc tcaagcccgg ctgctactgg cgcttcgact ggttcaagaa cgccgacaat			600
	ccgagcttca gcttccgtca ggtccagtgc ccagccgagc tcgtcgcctcg caccggatgc			660
35	cgccgcaacg acgacggcaa cttccctgcc gtccagatcc ccatgcgttc ctccccctc			720
	ctccgctccg ccggttgggc cggcctgccg gtggtggccc ttgccaagga tgatctcgcg			780
40	tactccccctc ctttctaccc ttccccatgg gcagatggtc agggatgaatg ggcggaagta			840
	tacaaacgcg ctgtagacat agtttcccag atgacgttga cagagaaagt caacttaacg			900
	actggaacag gatggcaact agagaggtgt gttggacaaa ctggcagtgt tcccagactc			960
45	aacatccccca gcttgtgttt gcaggatagt cctcttggta ttcgtttctc ggactacaat			1020
	tcagctttcc ctgcggtgtg taatgtcgtc gccacctggg acaagacgct cgctacctt			1080
50	cgtggtcagg caatgggtga ggagttcagt gataagggtg ttgacgttca gctgggtcct			1140
	gctgctggcc ctctcgggtg tcatccgat ggcggtagaa actgggaagg tttctcacca			1200
	gatccagccc tcaccggtgt actttttgcg gagacgatta agggatttca agatgctggt			1260
55	gtcattgcga cagctaagca ttatatcatg aacgaacaag agcatttccg ccaacaaccc			1320
	gaggctgcgg gttacggatt caacgtaagc gacagtttga gttccaacgt tgatgacaag			1380

ES 2 594 528 T3

actatgcatg aattgtacct ctggcccttc gcggatgcag tacgcgctgg agtcggtgct 1440
 gtcattgtgct cttacaacca aatcaacaac agctacgggt gcgagaatag cgaaactctg 1500
 5 aacaagcttt tgaaggcggg gcttggtttc caaggcttcg tcatgagtga ttggaccgct 1560
 catcacagcg gcgtaggcgc tgcttttagca ggtctggata tgtc gatgcc cggatgatgt 1620
 accttcgata gtggtacgtc tttctggggg gcaaacttga cggtcggtgt ccttaacggt 1680
 10 acaatcccc aatggcgtgt tgatgacatg gctgtccgta tcatggccgc ttattacaag 1740
 gttggccgcg acaccaaata caccctccc aacttcagct cgtggaccag ggacgaatat 1800
 15 ggtttcgcgc ataaccatgt ttcggaagg gcttacgaga ggtcaacga attcgtggac 1860
 gtgcaacgcg atcatgccga cctaaccgt cgcacggcg cgagagcac tgttctgctg 1920
 aagaacaagg gtgccttgcc cttgagccgc aaggaaaagc tggtcgccct tctgggagag 1980
 20 gatgcgggtt ccaactcgtg gggcgctaac ggctgtgatg accgtggttg cgataacggt 2040
 acccttgcca tggcctgggg tagcggact gcgaatttc catacctcgt gacaccagag 2100
 25 caggcgattc agaacgaagt tcttcagggc cgtggtaatg tcttcgccgt gaccgacagt 2160
 tgggcgctcg acaagatcgc tgcggctgcc cgccaggcca gcgtatctct cgtgttcgtc 2220
 aactccgact caggagaagg ctatcttagt gtggatggaa atgagggcga tcgtaacaac 2280
 30 atcactctgt ggaagaacgg cgacaatgtg gtcaagaccg cagcgaataa ctgtaacaac 2340
 accgttgctc tcatccactc cgtcggacca gttttgatcg atgaatggta tgaccacccc 2400
 35 aatgtcactg gtattctctg ggctggctct ccaggccagg agtctggtaa ctccattgcc 2460
 gatgtgctgt acggtcgtgt caaccctggc gccaaagtct ctttacttg gggcaagacc 2520
 cgggagtcgt atggttctcc cttggtcaag gatgccaaca atggcaacgg agcgcaccag 2580
 40 tctgatttca cccagggtgt tttcatcgat taccgccatt tcgataagtt caatgagacc 2640
 cctatctacg agtttgcta cggcttgagc tacaccacct tcgagctctc cgacctccat 2700
 45 gttcagcccc tgaacgcgtc ccgatacact cccaccagt gcatgactga agctgcaaag 2760
 aactttggtg aaattggcga tgcgctcggag tacgtgtatc cggaggggct ggaaaggatc 2820
 catgagttta tctatccctg gatcaactct accgacctga aggcacgctc tgacgattct 2880
 50 aactacggct ggaagactc caagtatatt cccgaaggcg ccacggatgg gtctgcccag 2940
 ccccgtttgc ccgctagtgg tgggtccgga ggaaccccc gtctgtacga ggatcttttc 3000
 55 cgcgtctctg tgaaggtaa gaacacggc aatgtcggc gtgatgaagt tcctcagctg 3060
 tacgtttccc taggcggccc gaatgagccc aagggtgtac tgcgcaagtt tgagcgtatt 3120
 cacttgcccc cttcgcagga ggccgtgtgg acaacgacc ttaccctcgt tgacctgca 3180

ES 2 594 528 T3

aactgggacg ttcgggctca ggactggacc gtcactcctt accccaagac gatctacgtt 3240
 5 ggaaactcct cacggaaact gccgctccag gcctcgctgc ctaaggccca gtaa 3294

<210> 64
 <211> 1097
 <212> PRT
 10 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 64

Met Arg Ser Ser Pro Leu Leu Arg Ser Ala Val Val Ala Ala Leu Pro
 15 1 5 10 15

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

Cys Lys Pro Ser Cys Gly Trp Ala Lys Lys Ala Pro Val Asn Gln Pro
 25 35 40 45

Val Phe Ser Cys Asn Ala Asn Phe Gln Arg Ile Thr Asp Phe Asp Ala
 50 55 60

Lys Ser Gly Cys Glu Pro Gly Gly Val Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln
 30 65 70 75 80

Thr Pro Trp Ala Val Asn Asp Asp Phe Ala Leu Gly Phe Ala Ala Thr
 35 85 90 95

Ser Ile Ala Gly Ser Asn Glu Ala Gly Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Glu
 40 100 105 110

Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Lys Met Val Val Gln
 45 115 120 125

Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu Asn
 130 135 140

Ile Pro Gly Gly Gly Val Gly Ile Phe Asp Gly Cys Thr Pro Gln Phe
 50 145 150 155 160

Gly Gly Leu Pro Gly Gln Arg Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Asn Glu
 55 165 170 175

Cys Asp Arg Phe Pro Asp Ala Leu Lys Pro Gly Cys Tyr Trp Arg Phe
 180 185 190

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Leu Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Ser Trp Gly Ala Asn Gly Cys
 660 665 670
 5 Asp Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser
 675 680 685
 10 Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln Ala Ile Gln
 690 695 700
 15 Asn Glu Val Leu Gln Gly Arg Gly Asn Val Phe Ala Val Thr Asp Ser
 705 710 715 720
 20 Trp Ala Leu Asp Lys Ile Ala Ala Ala Ala Arg Gln Ala Ser Val Ser
 725 730 735
 25 Leu Val Phe Val Asn Ser Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Leu Ser Val Asp
 740 745 750
 30 Gly Asn Glu Gly Asp Arg Asn Asn Ile Thr Leu Trp Lys Asn Gly Asp
 755 760 765
 35 Asn Val Val Lys Thr Ala Ala Asn Asn Cys Asn Asn Thr Val Val Ile
 770 775 780
 40 Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Glu Trp Tyr Asp His Pro
 785 790 795 800
 45 Asn Val Thr Gly Ile Leu Trp Ala Gly Leu Pro Gly Gln Glu Ser Gly
 805 810 815
 50 Asn Ser Ile Ala Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn Pro Gly Ala Lys
 820 825 830
 55 Ser Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr Gly Ser Pro Leu
 835 840 845
 60 Val Lys Asp Ala Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln Ser Asp Phe Thr
 850 855 860
 65 Gln Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys Phe Asn Glu Thr
 865 870 875 880
 70 Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr Thr Phe Glu Leu
 885 890 895

ES 2 594 528 T3

Ser Asp Leu His Val Gln Pro Leu Asn Ala Ser Arg Tyr Thr Pro Thr
900 905 910

5 Ser Gly Met Thr Glu Ala Ala Lys Asn Phe Gly Glu Ile Gly Asp Ala
915 920 925

10 Ser Glu Tyr Val Tyr Pro Glu Gly Leu Glu Arg Ile His Glu Phe Ile
930 935 940

15 Tyr Pro Trp Ile Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser Ser Asp Asp Ser
945 950 955 960

20 Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Lys Tyr Ile Pro Glu Gly Ala Thr Asp
965 970 975

Gly Ser Ala Gln Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly Ala Gly Gly Asn
980 985 990

25 Pro Gly Leu Tyr Glu Asp Leu Phe Arg Val Ser Val Lys Val Lys Asn
995 1000 1005

30 Thr Gly Asn Val Ala Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu Tyr Val Ser
1010 1015 1020

35 Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys Phe Glu
1025 1030 1035

40 Arg Ile His Leu Ala Pro Ser Gln Glu Ala Val Trp Thr Thr Thr
1040 1045 1050

45 Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Ser Ala Gln Asp
1055 1060 1065

Trp Thr Val Thr Pro Tyr Pro Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser
1070 1075 1080

50 Ser Arg Lys Leu Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Lys Ala Gln
1085 1090 1095

<210> 65
55 <211> 3294
<212> ADN
<213> Aspergillus oryzae
<400> 65

ES 2 594 528 T3

	atgcgttcct	ccccctcct	ccgctccgcc	gttgtggccg	ccctgccggt	gttggccctt	60
	gccgctgatg	gcaggtccac	ccgctactgg	gactgctgca	agccttcgtg	cggttgggcc	120
5	aagaaggctc	ccgtgaacca	gcctgtcttt	tcctgcaacg	ccaacttcca	gcgatcacg	180
	gacttcgacg	ccaagtccgg	ctgcgagccg	ggcgggtgctg	cctactcgtg	cgccgaccag	240
	accccatggg	ctgtgaacga	cgacttcgcg	ctcggttttg	ctgccacctc	tattgccggc	300
10	agcaatgagg	cgggctgggtg	ctgcgctctg	tacgagctca	ccttcacatc	cggtcctggt	360
	gctggcaaga	agatggtcgt	ccagtccacc	agcactggcg	gtgatcttgg	cagcaaccac	420
15	ttcgatctca	acatccccgg	cggcggcgtc	ggcatcttcg	acggatgcac	tccccagttc	480
	ggtgggtctgc	ccggccagcg	ctacggcggc	atctcgtccc	gcaacgagtg	cgatcggttc	540
	cccgacgccc	tcaagccccg	ctgctactgg	cgcttcgact	ggttcaagaa	cgccgacaat	600
20	ccgagcttca	gcttccgtca	ggtccagtgc	ccagccgagc	tcgtcgtctg	caccggatgc	660
	cgccgcaacg	acgacggcaa	cttccctgcc	gtccagatcc	ccatgcgttc	ctccccctc	720
25	ctccgctccg	ccgttgtggc	cgccctgccg	gtgttggccc	ttgccaagga	tgatctcgcg	780
	tactccccctc	ctttctacc	ttccccatgg	gcagatggtc	agggtgaatg	ggcggaaagta	840
	tacaaacgcg	ctgtagacat	agtttcccag	atgacgttga	cagagaaagt	caacttaacg	900
30	actggaacag	gatggcaact	agagaggtgt	gttggacaaa	ctggcagtgt	tcccagactc	960
	aacatcccca	gcttgtgttt	gcaggatagt	cctcttggta	ttcgtttctc	ggactacaat	1020
35	tcagctttcc	ctgcggggtgt	taatgtcgtc	gccacctggg	acaagacgct	cgcttacctt	1080
	cgtggctcagg	caatgggtga	ggagttcagt	gataagggta	ttgacgttca	gctgggtcct	1140
	gctgctggcc	ctctcgggtgc	tcatccgat	ggcggtagaa	actgggaaag	tttctcacca	1200
40	gatccagccc	tcaccggtgt	actttttgcg	gagacgatta	agggtattca	agatgctggt	1260
	gtcattgcga	cagctaagca	ttatatcatg	aacgaacaag	agcatttccg	ccaacaacc	1320
45	gaggctgcgg	gttacggatt	caacgtaagc	gacagtttga	gttccaacgt	tgatgacaag	1380
	actatgcatg	aattgtacct	ctggcccttc	gcggatgcag	tacgcgctgg	agtcggtgct	1440
	gttatgtgct	cttacaacca	aatcaacaac	agctacggtt	gcgagaatag	cgaaactctg	1500
50	aacaagcttt	tgaaggcggg	gcttggtttc	caaggcttcg	tcatgagtga	ttggaccgct	1560
	caacacagcg	gcgtaggcgc	tgcttttagca	ggtctggata	tgtcgatgcc	cggtgatggt	1620
55	accttcgata	gtggtacgtc	tttctgggg	gcaaacttga	cggtcgggtgt	ccttaacggt	1680
	acaatcccc	aatggcgtgt	tgatgacatg	gctgtccgta	tcatggccgc	ttattacaag	1740
	gttggccgcg	acaccaaata	caccctccc	aacttcagct	cgtggaccag	ggacgaatat	1800

ES 2 594 528 T3

ggtttcgcgc ataaccatgt ttcggaaggt gcttacgaga gggcaacga attcgtggac 1860
 5 gtgcaacgcg atcatgccga cctaaccgt cgcacggcg cgcagagcac tgttctgctg 1920
 aagaacaagg gtgccttgcc cttgagccgc aaggaaaagc tggtcgccct tctgggagag 1980
 gatgcggggt ccaactcgtg gggcgctaac ggctgtgatg accgtgggtg cgataacggt 2040
 10 acccttgcca tggcctgggg tagcgggtact gcgaatttcc catacctcgt gacaccagag 2100
 caggcgattc agaacgaagt tcttcagggc cgtggtaatg tcttcgccgt gaccgacagt 2160
 tgggcgctcg acaagatcgc tgcggctgcc cgccaggcca gcgtatctct cgtgttcgtc 2220
 15 aactccgact caggagaagg ctatcttagt gtggatggaa atgagggcga tcgtaacaac 2280
 atcactctgt ggaagaacgg cgacaatgtg gtcaagaccg cagcgaataa ctgtaacaac 2340
 20 accgttgca tcatccactc cgtcggacca gttttgatcg atgaatggta tgaccacccc 2400
 aatgtcactg gtattctctg ggctggctc ccaggccagg agtctggtaa ctccattgcc 2460
 gatgtgctgt acggtcgtgt caaccctggc gccaaagtct ctttcacttg gggcaagacc 2520
 25 cgggagtcgt atggttctcc cttggtcaag gatgccaaaca atggcaacgg agcgccccag 2580
 tctgatttca cccaggggtg tttcatcgat taccgccatt tcgataagtt caatgagacc 2640
 30 cctatctacg agtttgcta cggcttgagc tacaccacct tcgagctctc cgacctccat 2700
 gttcagcccc tgaacgcgtc ccgatacact cccaccagtg gcatgactga agctgcaaag 2760
 aactttggtg aaattggcga tgcgctcggag tacgtgtatc cggaggggct ggaaaggatc 2820
 35 catgagttta tctatccctg gatcaactct accgacctga aggcacgctc tgacgattct 2880
 aactacggct ggaagactc caagtatatt cccgaaggcg ccacggatgg gtctgcccag 2940
 40 ccccgtttgc ccgctagtgg tggtgccgga ggaacccccg gtctgtacga ggatcttttc 3000
 cgcgtctctg tgaaggtaaa gaacacgggc aatgtcgccg gtgatgaagt tcctcagctg 3060
 tacgtttccc taggcggccc gaatgagccc aaggtggtag tgcgcaagtt tgagcgtatt 3120
 45 cacttgcccc cttcgcagga ggccgtgtgg acaacgacct ttaccgctc tgaccttgca 3180
 aactgggacg tttcggctca ggactggacc gtcactcctt accccaagac gatctacggt 3240
 50 ggaaactcct cacggaaact gccgctccag gcctcgtcgc ctaaggccca gtaa 3294

<210> 66
 <211> 1097
 55 <212> PRT
 <213> *Aspergillus oryzae*
 <400> 66

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr Gly Cys Glu Asn
 485 490 495
 5
 Ser Glu Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ala Glu Leu Gly Phe Gln Gly
 500 505 510
 10
 Phe Val Met Ser Asp Trp Thr Ala Gln His Ser Gly Val Gly Ala Ala
 515 520 525
 15
 Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Val Thr Phe Asp Ser
 530 535 540
 20
 Gly Thr Ser Phe Trp Gly Ala Asn Leu Thr Val Gly Val Leu Asn Gly
 545 550 555 560
 25
 Thr Ile Pro Gln Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val Arg Ile Met Ala
 565 570 575
 30
 Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Thr Lys Tyr Thr Pro Pro Asn Phe
 580 585 590
 35
 Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Phe Ala His Asn His Val Ser
 595 600 605
 40
 Glu Gly Ala Tyr Glu Arg Val Asn Glu Phe Val Asp Val Gln Arg Asp
 610 615 620
 45
 His Ala Asp Leu Ile Arg Arg Ile Gly Ala Gln Ser Thr Val Leu Leu
 625 630 635 640
 50
 Lys Asn Lys Gly Ala Leu Pro Leu Ser Arg Lys Glu Lys Leu Val Ala
 645 650 655
 55
 Leu Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Ser Trp Gly Ala Asn Gly Cys
 660 665 670
 60
 Asp Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met Ala Trp Gly Ser
 675 680 685
 65
 Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu Gln Ala Ile Gln
 690 695 700
 70
 Asn Glu Val Leu Gln Gly Arg Gly Asn Val Phe Ala Val Thr Asp Ser

ES 2 594 528 T3

	705				710					715					720	
5	Trp	Ala	Leu	Asp	Lys 725	Ile	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Gln	Ala	Ser	Val	Ser 735
10	Leu	Val	Phe	Val	Asn 740	Ser	Asp	Ser	Gly 745	Glu	Gly	Tyr	Leu	Ser	Val	Asp 750
15	Gly	Asn	Glu	Gly	Asp 755	Arg	Asn	Asn	Ile 760	Thr	Leu	Trp	Lys	Asn	Gly	Asp 765
20	Asn	Val	Val	Lys	Thr	Ala	Ala	Asn	Asn	Cys	Asn	Asn	Thr	Val	Val	Ile 770
25	Ile	His	Ser	Val	Gly	Pro	Val	Leu	Ile	Asp	Glu 785	Trp	Tyr	Asp	His	Pro 790
30	Asn	Val	Thr	Gly	Ile 805	Leu	Trp	Ala	Gly	Leu	Pro	Gly	Gln	Glu	Ser	Gly 810
35	Asn	Ser	Ile	Ala	Asp 820	Val	Leu	Tyr	Gly 825	Arg	Val	Asn	Pro	Gly	Ala	Lys 830
40	Ser	Pro	Phe	Thr	Trp	Gly	Lys	Thr	Arg	Glu	Ser	Tyr	Gly	Ser	Pro	Leu 835
45	Val	Lys	Asp	Ala	Asn	Asn	Gly	Asn	Gly	Ala	Pro	Gln	Ser	Asp	Phe	Thr 845
50	Gln	Gly	Val	Phe	Ile	Asp	Tyr	Arg	His	Phe	Asp	Lys	Phe	Asn	Glu	Thr 850
55	Pro	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	Ser	Tyr	Thr	Thr	Phe	Glu	Leu 855
60	Ser	Asp	Leu	His	Val	Gln	Pro	Leu	Asn	Ala	Ser	Arg	Tyr	Thr	Pro	Thr 860
65	Ser	Gly	Met	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	Asn	Phe	Gly	Glu	Ile	Gly	Asp	Ala 865
70	Ser	Glu	Tyr	Val	Tyr	Pro	Glu	Gly	Leu	Glu	Arg	Ile	His	Glu	Phe	Ile 870
75							935					940				

ES 2 594 528 T3

Tyr Pro Trp Ile Asn Ser Thr Asp Leu Lys Ala Ser Ser Asp Asp Ser
 945 950 955 960
 5 Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Lys Tyr Ile Pro Glu Gly Ala Thr Asp
 965 970 975
 10 Gly Ser Ala Gln Pro Arg Leu Pro Ala Ser Gly Gly Ala Gly Gly Asn
 980 985 990
 15 Pro Gly Leu Tyr Glu Asp Leu Phe Arg Val Ser Val Lys Val Lys Asn
 995 1000 1005
 Thr Gly Asn Val Ala Gly Asp Glu Val Pro Gln Leu Tyr Val Ser
 1010 1015 1020
 20 Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Lys Val Val Leu Arg Lys Phe Glu
 1025 1030 1035
 25 Arg Ile His Leu Ala Pro Ser Gln Glu Ala Val Trp Thr Thr Thr
 1040 1045 1050
 30 Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Ser Ala Gln Asp
 1055 1060 1065
 35 Trp Thr Val Thr Pro Tyr Pro Lys Thr Ile Tyr Val Gly Asn Ser
 1070 1075 1080
 Ser Arg Lys Leu Pro Leu Gln Ala Ser Leu Pro Lys Ala Gln
 1085 1090 1095
 40
 <210> 67
 <211> 1415
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 45
 <400> 67
 atggtccatc tatcttcatt ggcagcagcc ctggctgctc tgctctgta tgtttaccca 60
 ctcacgagag gaggaacagc tttgacattg ctatagtgta tatggagctg gcctgaacac 120
 50 agcagccaaa gccaaaggac taaagtactt tggttccgcc acggacaatc cagagctcac 180
 ggactctgcg tatgtcgcgc aactgagcaa caccgatgat tttggtcaaa tcacaccg 240
 55 aaactccatg aaggtttgct tacgtctgcc tccctggagc attgcctcaa aagctaattg 300
 gttgttttgt ttggatagtg ggatgccacc gaggccttctc agaattcttt ttcgttcgca 360
 aatggagacg ccgtggtcaa tctggcgaac aagaatggcc agctgatgcg atgccatact 420

ES 2 594 528 T3

ctggtctggc acagtcagct accgaactgg ggtatgtaaa cgtcttgtct attctcaaat 480
 actctctaac agttgacagt ctctagcggg tcatggacca atgcgaccct tttggcggcc 540
 5 atgaagaatc atatcaccaa tgtggttact cactacaagg ggaagtgcta cgcctgggat 600
 gttgtcaatg aaggtttggt gctccatcta tcctcaatag ttcttttgaa actgacaagc 660
 10 ctgtcaatct agccctgaac gaggacggta ctttccgtaa ctctgtcttc taccagatca 720
 tcggcccagc atacattcct attgcttctg ccacggctgc tgccgcagat cccgacgtga 780
 aactctacta caacgactac aacattgaat actcaggcgc caaagcgact gctgcgcaga 840
 15 atatcgtcaa gatgatcaag gcctacggcg cgaagatcga cggcgtcggc ctccaggcac 900
 actttatcgt cggcagcact ccgagtcaat cggatctgac gaccgtcttg aagggtaca 960
 20 ctgctctcgg cgttgaggtg gcctataccg aacttgacat ccgcatgcag ctgccctcga 1020
 ccgccgcaaa gctggcccag cagtccactg acttccaagg cgtggccgca gcatgctta 1080
 gcaccactgg ctgctggtgg gtcactatct gggactggac cgacaagtac tcctgggtcc 1140
 25 ccagcgtggt ccaaggctac ggcgccccat tgccttggga tgagaactat gtgaagaagc 1200
 cagcgtacga tggcctgatg gcgggtcttg gagcaagcgg ctccggcacc acaacgacca 1260
 30 ctactactac ttctactacg acaggaggta cggaccctac tggagtcgct cagaaatggg 1320
 gacagtgtgg cggatttggc tggaccgggc caacaacttg tgtcagtggg accacttgcc 1380
 aaaagctgaa tgactggtac tcacagtgcc tgtaa 1415

35

<210> 68

<211> 397

<212> PRT

40 <213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 68

45 Met Val His Leu Ser Ser Leu Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Leu
 1 5 10 15

50 Val Tyr Gly Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Lys Gly Leu Lys
 20 25 30

Tyr Phe Gly Ser Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp Ser Ala Tyr
 35 40 45

55 Val Ala Gln Leu Ser Asn Thr Asp Asp Phe Gly Gln Ile Thr Pro Gly
 50 55 60

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

	Trp	Val	Pro	Ser	Val	Phe	Gln	Gly	Tyr	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Trp	Asp	
	305					310					315					320	
5	Glu	Asn	Tyr	Val	Lys	Lys	Pro	Ala	Tyr	Asp	Gly	Leu	Met	Ala	Gly	Leu	
					325					330					335		
10	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	
				340					345						350		
15	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Asp	Pro	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	Lys	Trp	Gly	Gln	
			355					360					365				
20	Cys	Gly	Gly	Ile	Gly	Trp	Thr	Gly	Pro	Thr	Thr	Cys	Val	Ser	Gly	Thr	
		370					375					380					
25	Thr	Cys	Gln	Lys	Leu	Asn	Asp	Trp	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu				
	385					390					395						
30	<210>	69															
	<211>	2564															
	<212>	ADN															
	<213>	Trichoderma reesei															
35	<400>	69															
	ggacagccgg	acgcaatggt	gaataacgca	gctcttctcg	ccgccctgtc	ggctctcctg											60
40	cccacggccc	tggcgcagaa	caatcaaaca	tacgccaaact	actctgctca	gggccagcct											120
45	gatctctacc	ccgagacact	tgccacgctc	acactctcgt	tccccgactg	cgaacatggc											180
50	cccctcaaga	acaatctcgt	ctgtgactca	tcggccggct	atgtagagcg	agcccaggcc											240
55	ctcatctcgc	tcttcaccct	cgaggagctc	attctcaaca	cgaaaactc	gggccccggc											300
60	gtgcctcgcc	tgggtcttcc	gaactaccaa	gtctggaatg	aggctctgca	cggcttggac											360
65	cgcgccaact	tcgccaccaa	gggcggccag	ttcgaatggg	cgacctcggt	ccccatgccc											420
70	atcctcacta	cggcggccct	caaccgcaca	ttgatccacc	agattgccga	catcatctcg											480
75	acccaagctc	gagcattcag	caacagcggc	cgttacggtc	tcgacgtcta	tgcgccaaac											540
80	gtcaatggct	tccgaagccc	cctctggggc	cgtggccagg	agacgcccgg	cgaagacgcc											600
85	tttttctca	gctccgccta	tacttacgag	tacatcacgg	gcatccaggg	tggcgtcgac											660
90	cctgagcacc	tcaaggttgc	cgccacggtg	aagcactttg	ccggatacga	cctcgagaac											720
95	tggaacaacc	agtcccgtct	cggtttcgac	gccatcataa	ctcagcagga	cctctccgaa											780
100	tactacactc	cccagttcct	cgctgcgggc	cgttatgcaa	agtcacgcag	cttgatgtgc											840

ES 2 594 528 T3

	gcatacaact	ccgtcaacgg	cgtgcccagc	tgtgccaaaca	gcttcttcct	gcagacgctt	900
	ttgcgcgaga	gctggggctt	ccccgaatgg	ggatacgtct	cgtecgattg	cgatgccgtc	960
5	tacaacgttt	tcaaccctca	tgactacgcc	agcaaccagt	cgtcagccgc	cgccagctca	1020
	ctgcgagccg	gcaccgatat	cgactgcggt	cagacttacc	cgtaggcacct	caacgagtcc	1080
	tttgtggccg	gcgaagtctc	ccgcggcgag	atcgagcggg	ccgtcaccgg	tctgtacgcc	1140
10	aacctcgtcc	gtctcggata	cttcgacaag	aagaaccagt	accgctcgtc	cggttggaag	1200
	gatgtcgtca	agactgatgc	ctggaacatc	tcgtacgagg	ctgctggtga	gggcatcgtc	1260
15	ctgctcaaga	acgatggcac	tctccctctg	tccaagaagg	tgcgcagcat	tgctctgatc	1320
	ggaccatggg	ccaatgccac	aaccctaatg	caaggcaact	actatggccc	tgccccatac	1380
	ctcatcagcc	ctctggaagc	tgctaagaag	gccggctatc	acgtcaactt	tgaactcggc	1440
20	acagagatcg	ccggcaacag	caccactggc	tttgccaagg	ccattgctgc	cgccaagaag	1500
	tcggatgcca	tcatctacct	cggtggaatt	gacaacacca	ttgaacagga	gggcgctgac	1560
25	cgcacggaca	ttgcttggcc	cggtaatcag	ctggatctca	tcaagcagct	cagcgaggtc	1620
	ggcaaacccc	ttgtcgtcct	gcaaattggc	ggtggtcagg	tagactcatc	ctcgtcctcaag	1680
	agcaacaaga	aggtcaactc	cctcgtctgg	ggcggatatac	ccggccagtc	gggaggcggt	1740
30	gccctcttcg	acattctctc	tggcaagcgt	gctcctgccg	gccgactggt	caccactcag	1800
	taccoggtcg	agtatgttca	ccaattcccc	cagaatgaca	tgaacctccg	acccgatgga	1860
35	aagtcaaacc	ctggacagac	ttacatctgg	tacaccggca	aaccctgcta	cgagtttggc	1920
	agtgggtctct	tctacaccac	cttcaaggag	actctcgcca	gccaccccaa	gagcctcaag	1980
	ttcaacacct	catcgatcct	ctctgctcct	caccccggt	acacttacag	cgagcagatt	2040
40	cccgtcttca	ccttcgaggc	caacatcaag	aactcgggca	agacggagtc	cccatatacg	2100
	gccatgctgt	ttgttcgcac	aagcaacgct	ggcccagccc	cgtacccgaa	caagtggctc	2160
45	gtcggattcg	accgacttgc	cgacatcaag	cctgggtcact	cttccaagct	cagcatcccc	2220
	atccctgtca	gtgctctcgc	ccgtgttgat	tctcaocggaa	accggattgt	ataccccggc	2280
	aagtatgagc	tagccttgaa	caccgacgag	tctgtgaagc	ttgagtttga	gttggtggga	2340
50	gaagaggtaa	cgattgagaa	ctggccggtg	gaggagcaac	agatcaagga	tgctacacct	2400
	gacgcataag	ggttttaatg	atgttgttat	gacaaacggg	tagagtagtt	aatgatggaa	2460
55	taggaagagg	ccatagtttt	ctgtttgcaa	accatttttg	ccattgcaaa	aaaaaaaaaa	2520
	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaa		2564

ES 2 594 528 T3

<210> 70
 <211> 780
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

5

<400> 70

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

ES 2 594 528 T3

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

ES 2 594 528 T3

Tyr Tyr Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Glu Ala Ala Lys
 450 455 460
 5
 Lys Ala Gly Tyr His Val Asn Phe Glu Leu Gly Thr Glu Ile Ala Gly
 465 470 475 480
 10
 Asn Ser Thr Thr Gly Phe Ala Lys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ser
 485 490 495
 15
 Asp Ala Ile Ile Tyr Leu Gly Gly Ile Asp Asn Thr Ile Glu Gln Glu
 500 505 510
 20
 Gly Ala Asp Arg Thr Asp Ile Ala Trp Pro Gly Asn Gln Leu Asp Leu
 515 520 525
 25
 Ile Lys Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys Pro Leu Val Val Leu Gln Met
 530 535 540
 30
 Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Lys Val
 545 550 555 560
 35
 Asn Ser Leu Val Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Val Ala
 565 570 575
 40
 Leu Phe Asp Ile Leu Ser Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val
 580 585 590
 45
 Thr Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Val His Gln Phe Pro Gln Asn Asp
 595 600 605
 50
 Met Asn Leu Arg Pro Asp Gly Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Ile
 610 615 620
 55
 Trp Tyr Thr Gly Lys Pro Val Tyr Glu Phe Gly Ser Gly Leu Phe Tyr
 625 630 635 640
 60
 Thr Thr Phe Lys Glu Thr Leu Ala Ser His Pro Lys Ser Leu Lys Phe
 645 650 655
 65
 Asn Thr Ser Ser Ile Leu Ser Ala Pro His Pro Gly Tyr Thr Tyr Ser
 660 665 670
 70
 Glu Gln Ile Pro Val Phe Thr Phe Glu Ala Asn Ile Lys Asn Ser Gly
 675 680 685

ES 2 594 528 T3

5 Lys Thr Glu Ser Pro Tyr Thr Ala Met Leu Phe Val Arg Thr Ser Asn
 690 695 700
 Ala Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg
 705 710 715 720
 10 Leu Ala Asp Ile Lys Pro Gly His Ser Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ile
 725 730 735
 15 Pro Val Ser Ala Leu Ala Arg Val Asp Ser His Gly Asn Arg Ile Val
 740 745 750
 20 Tyr Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Thr Asp Glu Ser Val Lys
 755 760 765
 25 Leu Glu Phe Glu Leu Val Gly Glu Glu Val Thr Ile
 770 775 780
 30 <210> 71
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 <400> 71
 actggattta ccatgacttt gtccaagatc acttcca 37
 35 <210> 72
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 40 <400> 72
 tcacctctag ttaattaagc gttgaacagt gcaggaccag 40
 45 <210> 73
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 50 <400> 73
 tgtcccttgt cgatgcg 17
 55 <210> 74
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 <400> 74

ES 2 594 528 T3

cacatgactt ggcttcc 17

5 <210> 75
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

10 <400> 75
 ggctaacata gcataggtga ttacttacct cgctcc 36

15 <210> 76
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

20 <400> 76
 ggagcgaggt aagtaatcac ctatgctatg ttagcc 36

25 <210> 77
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

30 <400> 77
 cctggtgttt gggcttccga tgaactgatc gccacaaca acacg 45

35 <210> 78
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

40 <400> 78
 cgtggtggtg ttggcgatca gttcatcgga agcccaaaca ccagg 45

45 <210> 79
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

50 <400> 79
 gccacaaca acacgtggac agtgaccatt cctgc 35

55 <210> 80
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus

<400> 80
 gcaggaatgg tcaactgtcca cgtggtggtg ttggc 35

<210> 81
 <211> 38

ES 2 594 528 T3

<212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

 <400> 81
 5 actggattta ccatgaacaa gtccgtggct ccattgct 38

 <210> 82
 <211> 38
 10 <212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

 <400> 82
 15 tcacctctag ttaattaact actttcttgc gagacacg 38

 <210> 83
 <211> 25
 <212> ADN
 20 <213> *Aspergillus fumigatus*

 <400> 83
 gggcatgctg gcctccacct tctcc 25
 25
 <210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus fumigatus*
 30
 <400> 84
 gggttaatta actacaggca ctgagagtaa 30

 35 <210> 85
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus fumigatus*

 40 <400> 85
 actggattta ccatgaagca ccttgcattt tccatcg 37

 <210> 86
 45 <211> 34
 <212> ADN
 <213> *Aspergillus fumigatus*

 <400> 86
 50 tcacctctag ttaattaataa ggacgggta gcgt 34

 <210> 87
 <211> 22
 55 <212> ADN
 <213> *Aspergillus fumigatus*

 <400> 87
 gtgaataacg cagctcttct cg 22

	<210> 88	
	<211> 25	
5	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
	<400> 88	
10	ccttaattaa ttatgcgtca ggtgt	25
	<210> 89	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
	<400> 89	
	cggactgcgc accatggtga ataacgcagc tct	33
20	<210> 90	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> <i>Trichoderma reesei</i>	
25	<400> 90	
	tcgccacgga gcttattatg cgtcaggtgt agcat	35
30	<210> 91	
	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus aculeatus</i>	
35	<400> 91	
	tcttgatcc accatggtcg gactgctttc aatcacc	37
40	<210> 92	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus aculeatus</i>	
	<400> 92	
45	ttaactcgag tcacagacac tgcgagtaat agtc	34
50	<210> 93	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> <i>Aspergillus aculeatus</i>	
	<400> 93	
55	cggactgcgc accatggtcg gactgctttc aat	33
	<210> 94	
	<211> 35	
	<212> ADN	

<213> *Aspergillus aculeatus*

<400> 94

tcgccacgga gcttatcaca gacactgcga gtaat

35

5

REIVINDICACIONES

1. Variante, que comprende sustituciones L90V + D131 S + M134L del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, donde la variante tiene actividad de mejora celulolítica y la variante es seleccionada del grupo consistente en:
- 5 (a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad de secuencia a la secuencia codificante deL polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o su secuencia de ADNc.
2. Variante según la reivindicación 1, que comprende o consiste en las sustituciones L90V + D131S + M134L+ A141W del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
- 10 3. Polinucleótido aislado que codifica la variante de la reivindicación 1 o 2.
4. Célula huésped que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3.
- 15 5. Método para producir una variante, que comprende:
 (a) cultivo de la célula huésped de la reivindicación 4 bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y
 (b) recuperación de la variante.
- 20 6. Planta transgénica, parte de la planta o célula vegetal transformada con el polinucleótido de la reivindicación 3.
7. Método de producción de la variante de la reivindicación 1 o 2, que comprende:
 (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica la variante bajo condiciones propicias para la producción de la variante; y
 25 (b) recuperación de la variante.
8. Método de obtención de una variante, que comprende la introducción en un polipéptido progenitor de las sustituciones L90V + D131S + M134L del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, donde la variante tiene actividad de mejora celulolítica y tiene al menos 85% de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; y recuperación de la variante.
- 30 9. Método para la degradación o conversión de un material celulósico, que comprende: el tratamiento del material celulósico con una composición enzimática en presencia de la variante de las reivindicaciones 1 o 2.
- 35 10. Método de la reivindicación 9, que comprende además la recuperación del material celulósico degradado.
11. Método de la reivindicación 9 o 10, donde la composición enzimática comprende una o varias enzimas seleccionadas del grupo consistente en una celulasa, un polipéptido con actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swolenina.
- 40 12. Método para la producción de un producto de fermentación, que comprende:
 (a) sacarificación de un material celulósico con una composición enzimática en presencia de la variante según la reivindicación 1 o 2;
 45 (b) fermentación del material celulósico sacarificado con uno o varios microorganismos fermentadores para producir el producto de fermentación; y
 (c) recuperación del producto de fermentación de la fermentación.
13. Método de fermentación de un material celulósico, que comprende: fermentación del material celulósico con uno o varios microorganismos fermentadores, donde el material celulósico se sacarifica con una composición enzimática en presencia de la variante según la reivindicación 1 o 2.
- 50 14. Método de la reivindicación 12 o 13, donde la composición enzimática comprende una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, un polipéptido con actividad de mejora celulolítica, una hemicelulasa, una expansina, una esterasa, una lacasa, una enzima ligninolítica, una pectinasa, una peroxidasa, una proteasa, y una swolenina.
- 55 15. Método de la reivindicación 13 o 14, donde la fermentación del material celulósico produce un producto de fermentación.
- 60 16. Método de la reivindicación 15, que comprende además la recuperación del producto de fermentación de la fermentación.
17. Composición de detergente que comprende la variante de la reivindicación 1 o 2 y un tensioactivo.
- 65 18. Formulación de caldo completo o composición de cultivo celular que comprende la variante de la reivindicación 1 o 2.

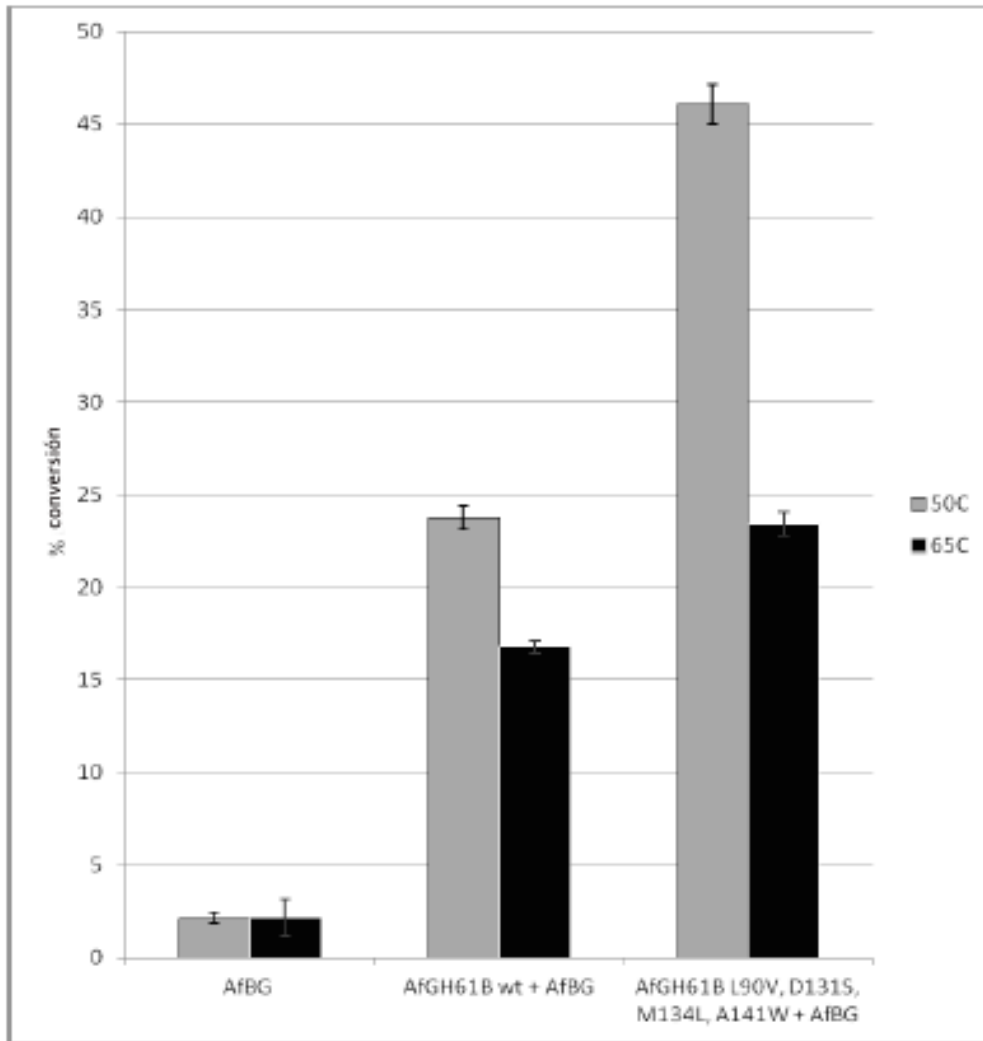


Fig 1

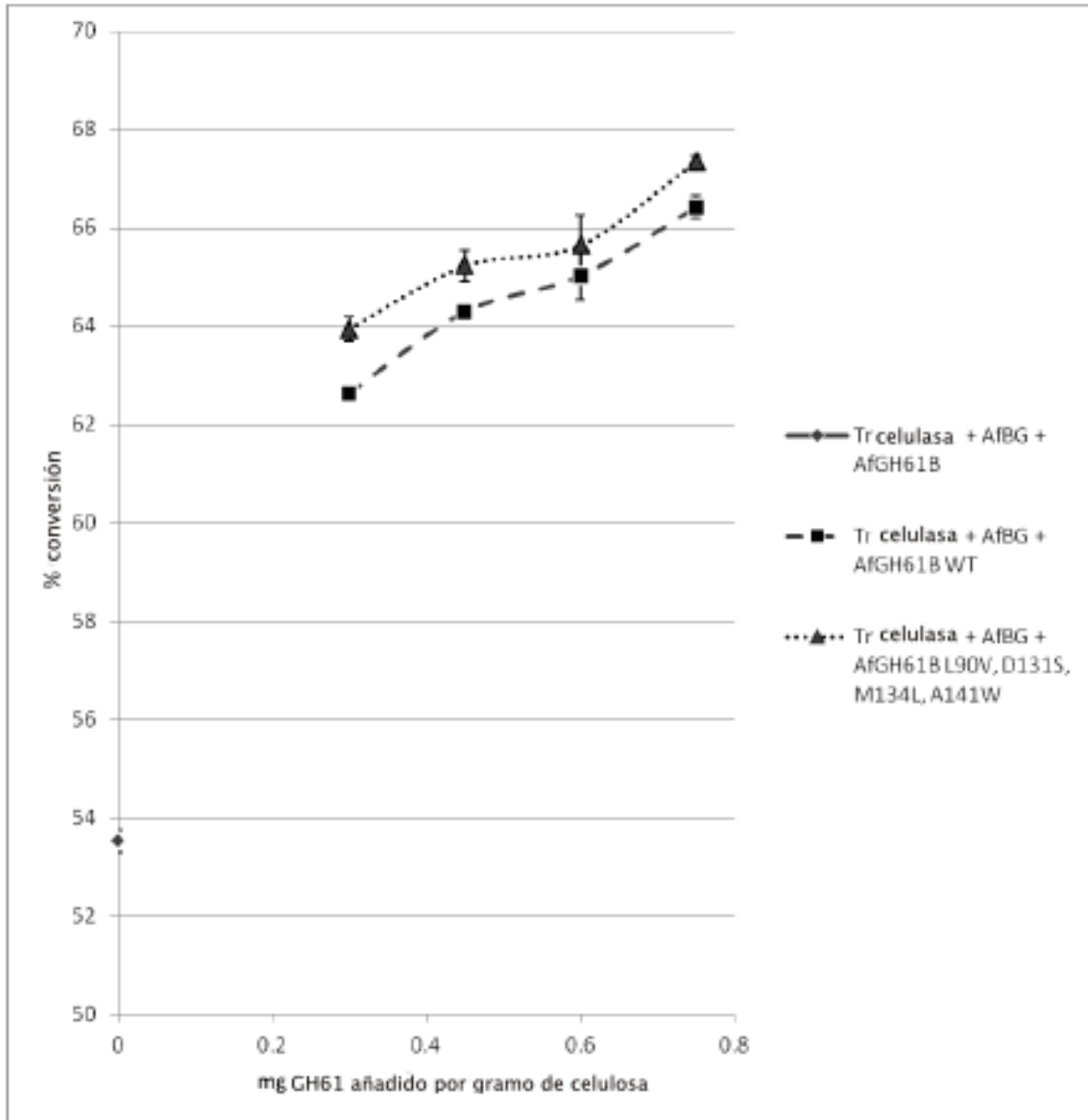


Fig. 2A

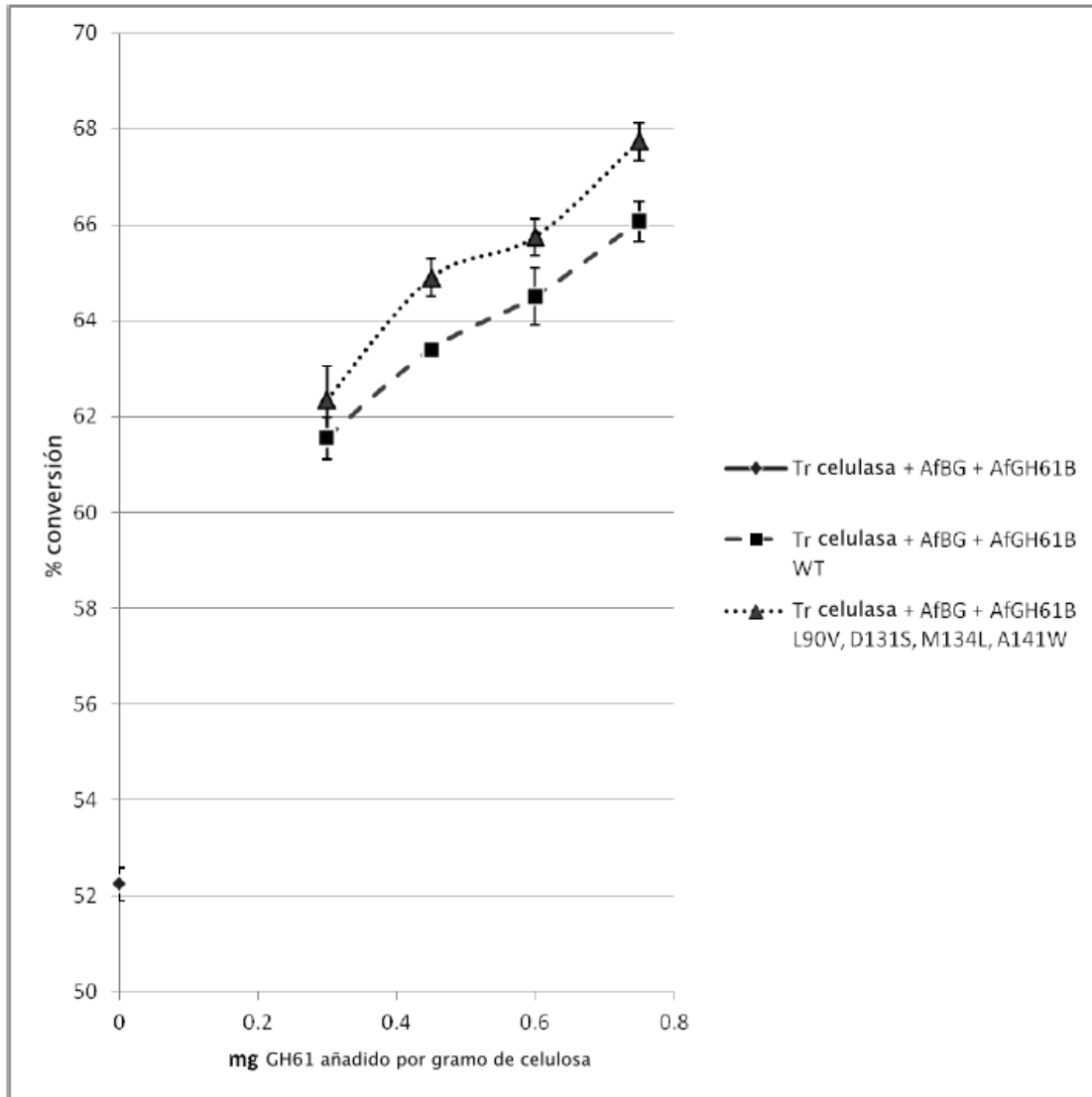


Fig. 2B

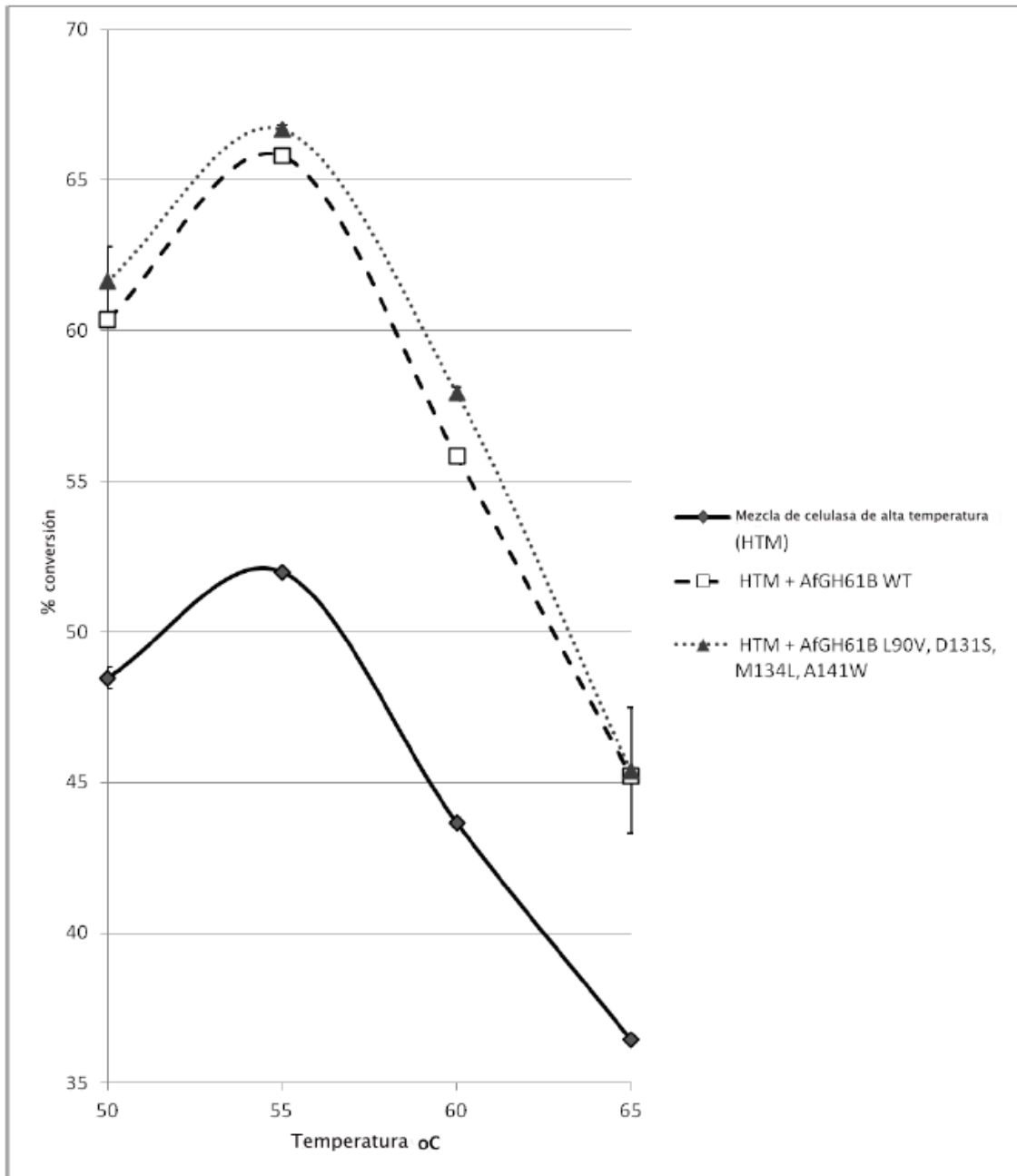


Fig. 3A

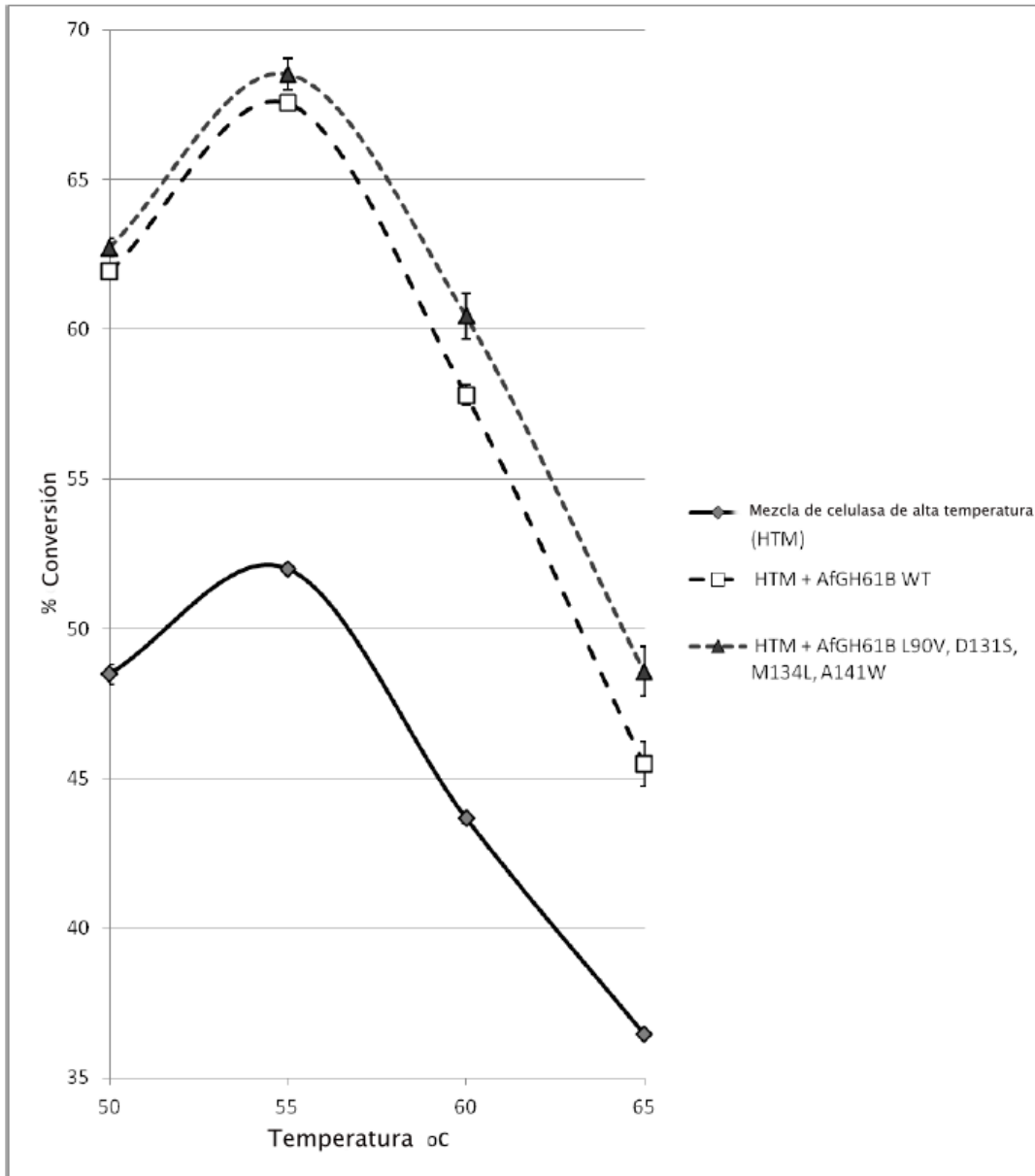


Fig. 3B