

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 612 744**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

**C12N 15/81** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2009 PCT/FR2009/051701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO10029259**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2009 E 09741395 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2342329**

54 Título: **Variantes de la beta-glucosidasa con actividad mejorada y sus usos**

30 Prioridad:

**12.09.2008 FR 0856167**

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

**18.05.2017**

73 Titular/es:

**IFP ÉNERGIES NOUVELLES (50.0%)  
1 & 4, avenue de Bois-Préau  
92852 Rueil-Malmaison Cedex, FR y  
PROTEUS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LOPES-FERREIRA, NICOLAS;  
MARGEOT, ANTOINE;  
MATHIS, HUGUES y  
FOURAGE, LAURENT**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 612 744 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 la beta-glucosidasa con actividad mejorada y sus usos

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a la expresión y a la optimización de enzimas implicadas en la degradación de la biomasa lignocelulósica. La presente invención se refiere más particularmente a variantes de la beta-glucosidasa que tienen al menos una modificación entre los aminoácidos situados en las posiciones 225, 238, 240 y 241 según la numeración de SEQ ID NO: 2 de la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, así como al uso de estas variantes de eficacia mejorada en los procedimientos de degradación de la celulosa y en los procedimientos de producción de biocombustibles (por ejemplo: etanol, butanol, isopropanol).

15 **Estado de la técnica**

La posibilidad de producir etanol a partir de celulosa ha recibido mucha atención debido a la disponibilidad de grandes cantidades de materia prima, así como de la limpieza del combustible como el etanol.

Las materias primas naturales de celulosa para un proceso de este tipo se conocen como "biomasa". Existen muchos tipos de biomasa, incluyendo madera, residuos agrícolas, cultivos herbáceos y los residuos sólidos municipales fueron considerados como materias primas para la producción de biocombustibles. Estos materiales consisten principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina.

La celulosa es un polímero constituido por moléculas de glucosa unidas por enlaces beta 1-4, que es muy resistente a la degradación o despolimerización por medio de ácidos, enzimas o microorganismos. Una vez que la celulosa se convierte en glucosa, se fermenta fácilmente en biocombustibles, por ejemplo, etanol, utilizando una levadura.

Los métodos más antiguos estudiados para convertir la celulosa en glucosa se basan en la hidrólisis ácida. Este proceso se puede realizar en presencia de ácidos concentrados o ácidos diluidos. Sin embargo, varios inconvenientes tales como la mala recuperación del ácido en el uso de ácidos concentrados y la baja producción de glucosa cuando se usan ácidos diluidos impiden que el proceso de hidrólisis ácida se pueda comercializar.

Para superar las desventajas del proceso de hidrólisis ácida, los procesos de conversión de la celulosa se han enfocado más recientemente a la hidrólisis enzimática, usando enzimas celulasa. Esta hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (por ejemplo, celulosa), sin embargo, tiene la desventaja de ser un proceso industrial costoso. Por lo tanto, es necesario el uso de cepas de microorganismos que secretan celulasas cada vez más eficientes.

Como tal, muchos microorganismos tienen enzimas que hidrolizan la celulosa, tales como hongos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Fusarium* así como bacterias tales como *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Cellulomonas* y *Streptomyces*. Las enzimas de estos microorganismos tienen tres tipos de actividades útiles en la conversión de celulosa en glucosa y se dividen en tres grupos: endoglucanasas, que atacan las fibras de celulosa al azar internamente, exoglucanasas que atacan a los extremos de las fibras liberando celobiosa y las beta-glucosidasas que hidrolizan la celobiosa a glucosa. Estas últimas constituyen el paso limitante del procedimiento de conversión de la celulosa. De hecho, la primera dificultad del procedimiento reside en la conversión de la celobiosa en glucosa, porque toda la celobiosa no hidrolizada al final del procedimiento representa una pérdida de rendimiento en la producción de biocombustibles.

Esta acumulación de celobiosa es un problema importante en la hidrólisis enzimática porque varios microorganismos productores de celulasas, incluyendo *Trichoderma*, producen muy poca beta-glucosidasa. De hecho, menos del 1 % de las proteínas totales producidas por las cepas de *Trichoderma* industriales son de tipo beta-glucosidasa. Esta pequeña cantidad de beta-glucosidasa tiene como resultado una baja capacidad para hidrolizar la celobiosa en glucosa; de ahí, su acumulación en el sistema. O una alta concentración de celobiosa inhibe la actividad de otras celulasas incluyendo las exoglucanasas para las que la celobiosa es el producto de reacción final.

Se han propuesto varios enfoques para aumentar la actividad de la beta-glucosidasa en los microorganismos y en consecuencia la conversión de celobiosa en glucosa.

Un primer enfoque consiste en añadir a las mezclas secretadas por los microorganismos beta-glucosidasa producida exógenamente para mejorar la hidrólisis. Sin embargo, este método no es comercialmente viable debido a que es demasiado caro.

Un segundo enfoque, como se describe en el documento WO92/010581, es utilizar la ingeniería genética para insertar nuevas copias del gen de la beta-glucosidasa en el genoma de los microorganismos, de modo que estos últimos producen una mayor cantidad de enzima.

Un tercer enfoque, descrito en el documento WO99/46362, es modificar genéticamente los microorganismos mediante el uso de una construcción genética que comprende un promotor, el gen de la beta-glucosidasa madura y la secuencia de la señal de secreción de xilanas. La presencia de la secuencia señal de secreción de xilanas permite aumentar significativamente la cantidad de beta-glucosidasa producida por microorganismos.

5 Sin embargo, para que una hidrólisis de la biomasa lignocelulósica sea eficaz y económicamente viable, la mezcla de enzimas debe ser producida por una única cepa microbiana y debe tener proporciones equilibradas de diversas actividades enzimáticas (incluyendo pero no exclusivamente exoglucanasas, endoglucanasas, xilanasas y beta-glucosidasas). Por ejemplo, en las mezclas nativas de *Trichoderma reesei* se encuentra generalmente la presencia de 70-80 % de exoglucanasas, 15-20 % de endoglucanasas, algunos porcentajes de hemicelulasas y

10 aproximadamente 0,5 % de beta-glucosidasa. Esta mezcla es adecuada para la hidrólisis de la mayoría de los sustratos pretratados (por ejemplo, la paja de trigo explosionada por vapor de agua en condiciones ácidas) con rendimientos aceptables. En resumen, el aumento de la actividad beta-glucosidasa, si se hace por enriquecimiento en cantidad de enzima no debe ser a costa de otras actividades enzimáticas.

15 En consecuencia, la posibilidad de obtener una alta actividad de beta-glucosidasa sin cambiar significativamente la proporción de todas las enzimas de la mezcla sería una ganancia significativa para el procedimiento de conversión de biomasa lignocelulósica en biocombustibles.

20 La técnica anterior cita varias secuencias que codifican para las beta-glucosidasas modificadas. Estas secuencias están disponibles con los números de EBI: ADM94194, B2ACC4, A4R3K4 y Q2GZ54.

### Objeto de la invención

25 Los solicitantes han tenido el gran mérito de encontrar, después de una extensa investigación, un polipéptido aislado o purificado que tiene actividad de beta-glucosidasa mejorada en relación con la actividad de beta-glucosidasa de la proteína BGL1 silvestre (SEQ ID NO: 2) que comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un aminoácido se modifica en comparación con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2, estando dicho aminoácido modificado seleccionado de las posiciones 225, 238, 240 y 241 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos 75 % de identidad de secuencia con la SEQ ID

30 NO: 2 y siendo dicho polipéptido seleccionado del grupo que consiste en

- una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14;
- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad, preferiblemente 95 %, 98 % o 99 % con la

35 secuencia SEQ ID NO: 2 y que comprende la modificación Q225H;

- una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad, preferiblemente 95 %, 98 % o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 2 y que comprende las modificaciones V238I, T240G y T241S y
- una secuencia de aminoácidos que tiene el menos 90 % de identidad, preferiblemente 95 %, 98 % o 99 % con la

40 SEQ ID NO: 2 y que comprende las modificaciones Q225H, V238I, T240G y T241S.

Además, los polipéptidos de acuerdo con la invención tienen la ventaja de ser menos sensible a la inhibición por la glucosa y retener de ese modo una mejor actividad beta-glucosidasa en presencia de una alta concentración de glucosa.

45 En una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que tiene una actividad beta-glucosidasa determinada en presencia de glucosa que está mejorada con respecto a la actividad beta-glucosidasa de la proteína BGL1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) determinada en ausencia de glucosa.

50 El experto puede determinar, por ejemplo, el aumento o dicho de otra manera la mejora de la actividad enzimática de un polipéptido de la invención mediante un ensayo enzimático utilizando el sustrato PNP-glucopiranosido. La cantidad de para-nitrofenol obtenida después de la acción de la beta-glucosidasa podría por ejemplo ser determinada mediante la lectura de la densidad óptica a 414 nm.

55 Un ejemplo de protocolo que el experto en la materia puede utilizar para determinar si un polipéptido de la invención tiene una actividad enzimática mejorada en comparación con la de la proteína BGL1 de tipo silvestre es el siguiente:

- formación de un cultivo de reserva de *E. coli* que expresa un polipéptido de la invención durante la noche a 37 °C;
- inoculación de un medio de cultivo LB con 1 % de cultivo de reserva durante 24 h a 20 °C;

60 – centrifugación durante 2 minutos a 13.000 rpm;

- resuspensión de los sedimentos celulares con tampón succinato 100 mM a pH 5 (DO<sub>600</sub> final 100);
- incubación de 50 µl de células con 100 µl de tampón succinato 100 mM a pH 5 que contiene 15 mM de pnp-glucopiranosido durante 1h30 a 50 °C, seguido de 5 minutos en hielo;
- adición de 150 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M;

65 – centrifugación durante 2 minutos a 13.000 rpm;

## ES 2 612 744 T3

- lectura de la densidad óptica a 414 nm en 150 µl de sobrenadante.

Por otra parte, los expertos en la técnica pueden usar el protocolo descrito anteriormente incubando los 50 µl de células con 100 µl de tampón succinato a pH 5 que contiene 15 mM pnp-glucopiranosido y 60 g/l de glucosa durante 1h30 a 50 °C, para determinar si un polipéptido de la invención es menos sensible a la inhibición por glucosa que la proteína BGL1 silvestre.

En el contexto de la invención, un aminoácido “modificado” significa un aminoácido “sustituido”, “insertado” o “eliminado”.

5 De acuerdo con una realización, el aminoácido “modificado” está “sustituido” en relación con la secuencia de los aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con una realización, el aminoácido “modificado” está “insertado” en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

15 De acuerdo con una realización, el aminoácido “modificado” está “eliminado” en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

20 De acuerdo con una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que al menos dos aminoácidos de la secuencia de aminoácidos están modificados en comparación con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, estando dichos aminoácidos modificados seleccionados de las posiciones 225, 238, 240 y 241 de la secuencia de SEQ ID No: 2.

25 De acuerdo con una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que al menos tres aminoácidos de la secuencia de aminoácidos están modificados en comparación con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, estando dichos aminoácidos modificados seleccionados de las posiciones 225, 238, 240 y 241 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

30 De acuerdo con una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que al menos cuatro aminoácidos de la secuencia de aminoácidos están modificados en comparación con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, siendo dichos aminoácidos modificados los de las posiciones 225, 238, 240 y 241 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

35 De acuerdo con una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que al menos uno, al menos dos, al menos tres, o al menos cuatro aminoácidos de la secuencia de aminoácidos están modificados en comparación con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, estando dichas modificaciones seleccionadas de Q225H, V238I, T240G y T241S.

40 De acuerdo con una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que un aminoácido está modificado en comparación con la secuencia SEQ ID NO: 2, siendo dicha modificación Q225H.

45 De acuerdo con una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que los tres aminoácidos están modificados en comparación con la secuencia SEQ ID NO: 2, siendo dichas alteraciones V238I, T240G y T241S.

De acuerdo con una realización, el polipéptido como se describe anteriormente se caracteriza por que los cuatro aminoácidos están modificados en comparación con la secuencia SEQ ID NO: 2, siendo dichas modificaciones Q225H, V238I, T240G y T241S.

50 De acuerdo con una realización, el polipéptido tal como se describe anteriormente comprende además al menos un aminoácido modificado adicional seleccionado de las posiciones 97, 99, 100, 118, 119, 121, 123, 126, 127, 128, 130, 132, 134, 135, 140, 147, 151, 153, 163, 168, 173, 174, 177, 179, 182, 187, 193, 206, 207, 212, 217 y 621 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.

55 De acuerdo con una realización, el polipéptido tal como se describe anteriormente se caracteriza por que dicho aminoácido modificado adicional comprende una o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en V97I, Y99F, S100G, V118T, N119E, I121M, E123Q, Q126E, F127Y, I128L, E130A, V132A, A134G, S135C, S135V, I140L, P147A, T151I, Q153H, V163T, T168A, G173A, G173S, Q174E, N177E, I179L, V182A, V182N, T187C, L193V, N206D, P207V, L212M, T217L, L621F y L621T.

60 También se describe aquí un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14 o
- 65 – una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: X que tiene: i) un porcentaje de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14 de al menos un 70 % de identidad, preferiblemente 75 %, 80 %, 85

%, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %; ii) un porcentaje de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: X de al menos 70 % de identidad, preferiblemente 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %.

5 Las variantes de secuencias de aminoácidos de la presente invención se pueden preparar por diversos métodos convencionales, tales como la mutagénesis aleatoria, la mutagénesis dirigida, la síntesis de genes o el barajado, utilizando todas o parte de las secuencias de nucleótidos o de péptidos presentados en este texto. Tales variantes incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de la enzima. La presente invención se refiere a cualquier variante obtenida a partir de las secuencias mostradas en este texto, siempre que las variantes de dichas secuencias de aminoácidos conserven una función beta-glucosidasa mejorada (como se define anteriormente) para Bgl-1.

También se describe en este documento una secuencia de aminoácidos, referida en lo sucesivo, por razones prácticas SEQ ID NO: X, que cuando se alinea con la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14, comprende:

- 15 a) un porcentaje de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14 de al menos 70 % de identidad, preferiblemente 75, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %; y  
 b) un porcentaje de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: X de al menos 70 % de identidad, preferiblemente 75, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %.

20 El porcentaje de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14 se corresponde con el número de residuos idénticos entre la SEQ ID NO: X y la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14 dividido por el número de residuos en la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14. Cuando se utiliza la base de datos GenomeQuest, dichos porcentajes de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14 corresponden a porcentajes de identidad de Interrogación (consulta % de id), donde Interrogación corresponde a la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14.

30 El porcentaje de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: X corresponde al número de residuos idénticos entre la SEQ ID NO: X y la SEQ ID NO: 4, 6, 8, 10, 12 o 14 dividido por el número de residuos en la SEQ ID NO: X. Cuando se utiliza la base de datos GenomeQuest, dichos porcentajes de residuos idénticos respecto a la longitud de la SEQ ID NO: X corresponden a porcentajes de identidad del Asunto (% id Asunto), donde Asunto corresponde a la SEQ ID NO: X.

35 La invención también se refiere a un ácido nucleico purificado o aislado que codifica para al menos un polipéptido como el descrito anteriormente. La Tabla 1 a continuación incluye las identificaciones de las secuencias de ácidos nucleicos y péptidos para los genes Bgl-1, los genes A y C, así como para los polipéptidos de la invención.

TABLA 1

Clones	Ácido nucleico	Polipéptido
BGL1 (silvestre)	SEQ NO: 1	SEQ NO: 2
10H7	SEQ NO: 3	SEQ NO: 4
59B8	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6
164A2	SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8
100B11	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
115E1	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 12
149G7	SEQ ID NO: 13	SED ID NO: 14
Gen A	SEQ ID NO: 15	SED ID NO: 16
Gen C	SEQ ID NO: 17	SED ID NO: 18

40 La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico como se describe anteriormente.

Según la invención, por "vector" se entiende cualquier secuencia de ADN en la cual es posible insertar fragmentos de ácido nucleico extraño, vectores que permiten la introducción de ADN extraño en una célula hospedadora. Ejemplos de vectores son plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales de levaduras (YAC), cromosomas artificiales de bacterias (BAC) y cromosomas artificiales derivados del bacteriófago P1 (PAC), los vectores derivados de virus.

Según la invención, el ácido nucleico como se describe anteriormente se puede unir operativamente a un promotor, un terminador o cualquier otra secuencia necesaria para la expresión en la célula hospedadora.

50 El vector de acuerdo con la invención puede incluir también un marcador de selección. Por "marcador de selección", se entiende un gen cuya expresión confiere a las células que lo contienen una característica que permite seleccionarlas. Este es por ejemplo un gen de resistencia a los antibióticos.

55 La invención también se refiere a una célula hospedadora aislada que comprende o bien al menos uno de los polipéptidos como se ha descrito anteriormente, o al menos uno de los ácidos nucleicos como se describe

anteriormente o al menos uno de los vectores como se describe anteriormente.

5 Los expertos en la técnica pueden introducir al menos uno de los polipéptidos, al menos uno de los ácidos nucleicos o al menos uno de los vectores como los descritos anteriormente en la célula hospedadora mediante métodos convencionales bien conocidos. Por ejemplo, se pueden mencionar el tratamiento con cloruro de calcio, electroporación, el uso de una pistola de partículas.

De acuerdo con una realización, el experto en la materia puede introducir en la célula hospedadora y por métodos convencionales, varias copias de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una mayor actividad beta-glucosidasa de acuerdo con la invención.

10 De acuerdo con una realización, la célula hospedadora aislada como se describe anteriormente se selecciona de *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Saccharomyces*.

15 De acuerdo con una realización preferida, la célula hospedadora aislada como se describe anteriormente se selecciona de *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisea*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica* y sus mezclas.

20 De acuerdo con una realización preferida, la célula hospedadora aislada como se describe anteriormente es *Trichoderma reesei*.

25 La invención también se refiere al uso de cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente para la hidrólisis de beta-oligosacáridos.

La invención también se refiere al uso de uno cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente para la hidrólisis de la celobiosa en glucosa.

30 La invención también tiene por objeto la utilización de uno cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente para la producción de biocombustible.

35 De acuerdo con la invención, el término biocombustible puede ser definido como cualquier producto de la transformación de la biomasa que se puede utilizar con fines energéticos. Por un lado, y sin querer imponer ninguna limitación, se puede citar a título de ejemplo, productos de biogás que se pueden incorporar (posiblemente después de su tratamiento) a un combustible o ser totalmente un combustible, tales como alcoholes (etanol, butanol y/o isopropanol según el tipo de organismo de fermentación utilizado), disolventes (acetona), ácidos (ácido butírico), lípidos y sus derivados (ácidos grasos de cadena corta o larga, ésteres de ácidos grasos), así como hidrógeno.

40 Preferiblemente, el biocombustible de acuerdo con la invención es un alcohol, por ejemplo etanol, butanol y/o isopropanol. Más preferiblemente, el biocombustible de acuerdo con la invención es etanol.

En otra realización, el biocombustible es biogás.

45 Además de la producción de biocombustible, los polipéptidos que tienen una actividad de beta-glucosidasa mejorada de acuerdo con la invención también se puede utilizar en otros tipos de aplicaciones en las que catalizan la hidrólisis de diversos sustratos, lo que permite la liberación de una variedad de aromas. Por ejemplo, se pueden utilizar para liberar aromas de frutas catalizando varios glucósidos presentes dentro de estas frutas o incluso pueden hidrolizar las beta-glucosidasas monoterfenil de las uvas que representan una fuente importante de sabores para el vino. Por lo tanto, los polipéptidos que tienen una mejor actividad beta-glucosidasa de acuerdo con la invención se pueden utilizar en varias áreas, incluyendo en perfumería, industria alimentaria, enología, etc.

50 Las cepas de hongos filamentosos, preferiblemente *Trichoderma*, más preferiblemente *T. reesei*, capaces de expresar al menos un polipéptido de acuerdo con la invención se cultivan en fermentadores en presencia de un sustrato de carbono, tales como lactosa o glucosa, seleccionados para el crecimiento del microorganismo. En una realización, este sustrato carbonado, por su naturaleza, se introduce en el fermentador antes de la esterilización o se esteriliza por separado y se introduce al fermentador después de la esterilización de este último para obtener una concentración inicial de 20 a 35 g/l.

60 A continuación se añade una solución acuosa que contiene el sustrato elegido para la producción de enzimas. Una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica producida por hongos finalmente se recupera por filtración del medio de cultivo. Esta composición, en particular incluye endoglucanasa, exoglucanasa y la beta-glucosidasa de acuerdo con la invención. En una realización, la solución acuosa que contiene el sustrato elegido para la producción de enzimas se prepara a una concentración de 200 a 250 g/l; esta solución debe contener el sustrato inductor tal como lactosa. Esta solución acuosa se inyecta después del agotamiento del sustrato carbonado inicial a fin de proporcionar una cantidad optimizada, comprendida entre 35 y 45 mg/g de células ("lote alimentado").

65

Durante esta fase de "lote alimentado", la concentración residual de azúcar en el medio de cultivo es menor que 1 g/l y las enzimas que actúan sobre la biomasa lignocelulósica son secretadas por el hongo. Estas últimas pueden recuperarse por filtración del medio de cultivo.

5 La invención tiene por objeto una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica, estando producida dicha composición enzimática por hongos filamentosos y que comprende al menos un polipéptido que tiene una actividad beta-glucosidasa mejorada con respecto a la actividad beta-glucosidasa de la proteína BGL1 de tipo silvestre.

10 Finalmente, la invención tiene por objeto un procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa que comprende las siguientes etapas:

- suspender en fase acuosa el material a hidrolizar;
  - añadir una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica como se describe anteriormente;
- 15
- dosificar los azúcares liberados;
  - separar la solución de azúcar de la fracción sólida no hidrolizada;
  - fermentar la solución de azúcar;
  - separar el biocombustible del caldo de fermentación.

20 En una realización, el material a ser hidrolizado se suspende en una fase acuosa a razón de 6 a 40 % de materia seca, preferiblemente de 20 a 30 %. El pH se ajusta entre 4 y 5,5, preferiblemente entre 4,8 y 5,2 y la temperatura entre 40 y 60 °C, preferiblemente entre 45 y 50 °C. La reacción de hidrólisis se inicia mediante la adición de la composición de enzima que actúa sobre la biomasa lignocelulósica; la cantidad normalmente utilizada es de 10 a 30 mg de proteínas excretadas por gramo de sustrato pretratado o menos. La reacción dura generalmente de 15 a 48

25 horas. La reacción se sigue mediante el ensayo de azúcares libres, en particular la glucosa. La solución de azúcar se separa de la fracción sólida no hidrolizada, constituida esencialmente por lignina, por filtración o centrifugación; esta se utiliza para la fermentación.

En una realización, el biocombustible puede separarse del caldo de fermentación por destilación.

30 Otro objeto de la invención es un procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- suspender en fase acuosa la biomasa a hidrolizar;
- 35
- añadir simultáneamente una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica como se describe anteriormente y un organismo de fermentación;
  - separar el biocombustible del caldo de fermentación.

40 De acuerdo con esta realización, la celulosa presente en la biomasa se convierte en glucosa y, al mismo tiempo, en el mismo reactor, el organismo de fermentación, tal como una levadura) convierte la glucosa en el producto final de acuerdo con un procedimiento de SSF (sacarificación simultánea y fermentación) conocido por la persona experta en la materia. De acuerdo con las capacidades metabólicas e hidrolíticas del organismo de fermentación, el buen desarrollo de la operación puede requerir la adición de una cantidad más o menos grande de la mezcla celulolítica exógena.

45 En otra realización, un mismo organismo de fermentación puede ser capaz de convertir la glucosa en biomasa y la glucosa en el producto final.

50 El uso del polipéptido que tiene actividad beta-glucosidasa mejorada de acuerdo con la presente invención tiene por lo tanto la ventaja de obtener un mejor rendimiento de la producción de glucosa. Por lo tanto, la presente invención permite utilizar menos enzima que antes, lo que tiene una ventaja económica, siendo menor el coste de la producción del biocombustible.

### Descripción de las figuras

55 Otros aspectos, objetos, ventajas y características de la invención se presentarán a la lectura de la memoria descriptiva no restrictiva que sigue y que describe realizaciones preferidas de la invención dadas a modo de ejemplo y de la figura 1.

60 La Figura 1 es un gráfico que representa la mejora de la actividad beta-glucosidasa para las variantes 149G7, 100B11, 115E1 en comparación con el gen parental BGL1, en presencia de glucosa.

65 La Figura 2 es un gráfico que representa la actividad beta-glucosidasa específica de las mezclas enzimáticas producidas en matraces por los clones transformados (100B11, 164A2 y 115E1) y la cepa de partida CL847. Se muestra la cepa CL847-bgl1+ a título comparativo.

La Figura 3 es un gráfico que representa los resultados de los hidrolizados (glucosa liberada) para las enzimas producidas por la cepa de referencia (CL847) y la variante (100B11).

## 5 Descripción detallada de la invención

### Ejemplos

#### EJEMPLO 1: 1ª ronda de barajado

La secuencia del gen de la beta-glucosidasa *Trichoderma reesei* (gen parental BGL1, SEQ ID NO: 1) se sometió a una primera ronda de barajado de acuerdo con el método patentado descrito en el documento EP 1104457B1 con el gen de la glucosidasa putativo de *Chaetomium globosum* (gen A) (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16 (secuencia de la proteína)) que tiene 70 % de identidad con el gen parental BGL1.

#### 1- Cribado de alto rendimiento

Se utilizó un ensayo de cribado de alto rendimiento para seleccionar los mejores clones obtenidos del barajado aleatorio de estas dos secuencias, es decir, los que tienen un factor de mejora mayor que 2 a nivel de la actividad de la beta-glucosidasa en comparación con el gen parental BGL1 de *T. reesei*.

El ensayo de cribado del banco en la primera ronda de barajado se realizó de acuerdo con las siguientes etapas:

- aislamiento en agar de diferentes colonias de *E. coli* que expresan las variantes de barajado de la enzima recombinante de acuerdo con la invención y pre-cultivos en medio LB de dichas colonias durante la noche a 37 °C;
- inoculación de un medio LB al 3 % con el pre-cultivo y 4 h de incubación a 37 °C;
- inducción de la expresión de las variantes por adición de isopropil-beta-tio-galactósido (IPTG) 100 µM e incubación a 20 °C durante la noche;
- centrifugación durante 2 minutos a 13.000 rpm;
- resuspensión de los sedimentos celulares en 100 µl de tampón succinato 0,1 M que contienen 2,2 mM de p-nitrofenil-D-glucósido-6-fosfato (pNPGlc);
- 3 h de incubación a temperatura ambiente;
- lectura de la densidad óptica a 414 nm después de alcalinizar.

En estas condiciones de detección, se observó una mejora en la actividad beta-glucosidasa en relación con la enzima de referencia BGL1 en varios clones, incluyendo los clones 10H7 (SEQ ID NO: 3 y 4), 59B8 (SEQ ID NO: 5 y 6) y 164A2 (SEQ ID NO: 7 y 8).

#### 2 - Determinación de la mejora de la actividad β-glucosidasa.

##### 2-1/ En el sustrato pNPGlc

Para determinar la kcat relativa de las variantes seleccionadas en la primera ronda de barajado, se procede de la manera siguiente:

- formación de un cultivo de reserva de *E. coli* que expresa una enzima recombinante de acuerdo con la invención durante la noche a 37 °C;
- inoculación de un medio de cultivo LB con 1 % de cultivo de reserva durante 24 h a 20 °C con inducción con IPTG (250 µM);
- centrifugación durante 2 minutos a 13.000 rpm;
- resuspensión de los sedimentos celulares con tampón succinato 100 mM a pH 5 (DO<sub>600</sub> final 100);
- incubación de 50 µl de células con 100 µl de tampón succinato 100 mM a pH 5 que contiene 15 mM de pnp-glucopiranosido durante 1h30 a 50 °C, seguido de 5 minutos en hielo;
- adición de 150 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,2 M;
- centrifugación durante 2 minutos a 13.000 rpm;
- lectura de la densidad óptica a 414 nm en 150 µl de sobrenadante.

La Tabla 2 muestra los valores de kcat, así como los factores de mejora obtenidos para los clones 10H7, 59B8 y 164A2 en estas condiciones experimentales.

**TABLA 2: Mejora de la actividad beta-glucosidasa (resultados de los cultivos inducidos)**



	Clones	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Factor de mejora
Clones de la 1ª ronda	10H7	590,0	8
	59B8	518,6	7
	164A2	1.437,3	20
Proteína de referencia	BGLI	71,0	1

Los resultados muestran mejoras muy importantes de las actividades enzimáticas en comparación con la enzima de referencia (BGLI) para los 3 clones 10H7, 59B8 y 164A2.

## 5 2-2/ En la celobiosa

A continuación, la mejora de la actividad de los clones 10H7, 59B8 y 164A2 se confirmó en un segundo sustrato: la celobiosa.

10 Este ensayo se realizó en cultivos de *E. coli* que expresan una enzima recombinante de acuerdo con la invención. Las etapas del ensayo son las siguientes:

- Inocular un medio de cultivo LB con 1 % de cultivos de reserva inducidos con IPTG e incubar durante la noche a 37 °C.
- 15 – Cultivar dichas células a 37 °C hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0,4.
- Inducir dichas células con IPTG 250  $\mu\text{M}$  a 20 °C durante 20 horas.
- Lavar los sedimentos celulares tres veces en un tampón succinato 100 mM pH 5 para eliminar la glucosa del medio de cultivo.
- 20 – Incubar 10  $\mu\text{l}$  de dichas células con 190  $\mu\text{l}$  de celobiosa 263,2 mM (250 mM final) durante 12 horas a 50 °C en microplaca.

### Exposición:

- 25 – Mezclar e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
  - 10  $\mu\text{l}$  de la reacción anterior
  - 90  $\mu\text{l}$  tampón succinato 100 mM a pH 5
  - 5  $\mu\text{l}$  de glucosa oxidasa 44 U/ml
- 30 – Mezclar e incubar durante 30 min a temperatura ambiente
  - 10  $\mu\text{l}$  de la reacción de la glucosa oxidasa
  - 2  $\mu\text{l}$  de peroxidasa de rábano 10 U/ml
  - 5  $\mu\text{l}$  de ABTS 100 mM
  - 35 – 83  $\mu\text{l}$  de tampón de fosfato 50 mM pH 7,4

Leer las densidades ópticas a 420 nm.

40 **TABLA 3: Mejora de la actividad beta-glucosidasa (resultados de los cultivos inducidos)**

	Clones	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Factor de mejora
Clones de la 1ª ronda	10H7	69,1	13
	59B8	37,7	7
	164A2	213,2	41
Proteína de referencia	BGLI	5,2	1

Del mismo modo, los resultados mostraron mejoras muy significativas de las actividades enzimáticas con respecto a la enzima de partida (BGL1) para los clones 10H7, 59B8 y 164A2 cuando se utiliza la celobiosa como sustrato.

## 45 **EJEMPLO 2: Segunda ronda de barajado**

Las secuencias de los genes mejoradas obtenidas en la primera ronda de barajado se someten posteriormente a una segunda ronda de barajado (siempre de acuerdo con el método patentado descrito en el documento EP1104457B1). Para aumentar la diversidad genética, se añade por lo menos un gen que codifica para una beta-glucosidasa que tiene un 70 % de identidad. En este ejemplo específico, se utilizó el gen de la glucosidasa putativo de *Neurospora crassa* (gen C) (SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 (secuencia de la proteína)).

### **1- Cribado de alto rendimiento**

Un ensayo de cribado de alto rendimiento como el descrito anteriormente (con la excepción de la etapa de inducción con IPTG, ya que la mejora obtenida en la primera ronda de barajado permite la detección de la actividad beta-glucosidasa basada únicamente en el control del promotor) se realizó en los clones obtenidos después de esta segunda ronda de barajado, para seleccionar los mejores clones, es decir, los que tienen un factor de mejora mayor que 2 a nivel de la actividad de la beta-glucosidasa en comparación con el clon 164A2.

En estas condiciones de cribado, se encontró una mejora de la actividad beta-glucosidasa respecto a la enzima de referencia (164A2) en varios clones, concretamente en los clones 100B11 (SEQ ID NO: 9 y 10), 115E1 (SEQ ID NO: 11 y 12).

## **2 - Determinación de la mejora de la actividad $\beta$ -glucosidasa.**

### **2-1/ En el pNPGlc**

Para determinar la  $k_{cat}$  relativa, se midieron las actividades de los clones 100B11 y 115E1 mediante el ensayo de actividad como se describe anteriormente.

La tabla 4 muestra los valores de  $k_{cat}$ , así como los factores de mejora obtenidos para los clones 100B11 y 115E1 en estas condiciones experimentales.

**TABLA 4: Mejora de la actividad beta-glucosidasa (resultados de los cultivos inducidos)**

	Clones	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Factor de mejora
Clones de la 2ª ronda	100B11	4342,8	3,0
	115E1	3989,2	2,8
Proteína de referencia	164A2	1437,3	1

Los resultados muestran mejoras muy importantes de las actividades enzimáticas en relación con la enzima de referencia (164A2) y (BGLI) (X60) para los clones 100B11 y 115E1.

### **2-2/ En la celobiosa**

La mejora de la actividad de los clones 100B11 y 115E1 se confirmó a continuación en un segundo sustrato: la celobiosa.

Para determinar la  $k_{cat}$  relativa, las actividades de los clones 100B11 y 115E1 se midieron mediante el ensayo de actividad como se describe anteriormente usando celobiosa como sustrato.

**TABLA 5: Mejora de la actividad beta-glucosidasa (resultados de los cultivos inducidos)**

	Clones	$K_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Factor de mejora
Clones de la 2ª ronda	100B11	387,2	1,8
	115E1	406,4	1,9
Proteína de referencia	164A2	213,2	1

Del mismo modo, los resultados muestran mejoras significativas de las actividades enzimáticas en relación con la enzima de referencia (164A2) para los clones 100B11 y 115E1 cuando se utiliza la celobiosa como sustrato.

## **EJEMPLO 3: 3ª ronda de barajado**

Las secuencias de los genes mejoradas obtenidas en la segunda ronda de barajado se someten posteriormente a una tercera ronda de barajado (siempre de acuerdo con el método patentado descrito en el documento EP1104457B1). Para aumentar la diversidad genética, se añade por lo menos un gen que codifica para una beta-glucosidasa que tiene un 70 % de identidad. En este ejemplo específico, se utilizó el gen de la glucosidasa putativo de *Neurospora crassa* (gen C) (SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 y el gen de la glucosidasa putativo de *Chaetomium globosum* (gen A) (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16).

### **1- Cribado de alto rendimiento**

Un ensayo de cribado de alto rendimiento como el descrito anteriormente (con la excepción de la etapa de inducción con IPTG, ya que la mejora obtenida en la primera ronda de barajado permite la detección de la actividad beta-glucosidasa basada únicamente en el control del promotor) se realizó en los clones obtenidos después de esta tercera ronda de barajado, para seleccionar los mejores clones, es decir, los que tienen un factor de mejora mayor que 2 a nivel de la actividad de la beta-glucosidasa en comparación con el clon 115E1.

En estas condiciones de cribado, se encontró una mejora de la actividad beta-glucosidasa respecto a la enzima de referencia (115E1) en varios clones, concretamente en el clon 149G7 (SEQ ID NO: 13 y 14).

## **2 - Determinación de la mejora de la actividad $\beta$ -glucosidasa.**

### **2-1/ En el pNPGlc**

Para determinar la kcat relativa, la actividad del clon 149G7 se midió mediante el ensayo de actividad como se describe anteriormente.

Los resultados muestran una mejora de la actividad enzimática del clon 149G7 de 2,4 veces con respecto al clon 115E1 y de más de 100 veces con respecto a BGL1.

### **EJEMPLO 4: Actividad $\beta$ -glucosidasa mejorada en presencia de glucosa**

Para comparar la actividad de los clones 149G7, 100B11, 115E1 con BGL1, la actividad de estos clones se midió mediante el ensayo de actividad como se describe anteriormente en el pNPGlc en presencia de 60 g/l de glucosa en el medio de reacción (producto de la reacción).

La Figura 1 muestra que el clon 149G7 retiene 61 % de su actividad en presencia de 60 g/l de glucosa mientras que la proteína parental de referencia BGL1 no retiene más que el 27 %.

Aunque la presente invención ha sido descrita anteriormente por medio de ejemplos de sus realizaciones preferidas, se entiende que se puede modificar sin apartarse del espíritu y la naturaleza de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

### **EJEMPLO 5: Transformación de *T. reesei* con las variantes mejoradas de beta-glucosidasas**

Cada gen correspondiente a las variantes 115E1, 100B11 y 164A2, se clonó en un vector que permite la expresión en *Trichoderma reesei* con selección por higromicina. El gen se coloca bajo el control de un promotor fuerte *cbh1*, inducible junto con otras celulasas de *T. reesei*.

La transformación de *Trichoderma reesei* se llevó a cabo de acuerdo con métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica (transformación de protoplastos por impacto de calcio y selección con higromicina 50  $\mu$ g/ml). Los transformantes se purificaron mediante esporulación y se subcultivaron dos veces en medio selectivo para la eliminación de clones inestables. La integración del ADN de interés se verificó después por PCR de acuerdo con el método descrito por Yu et al., Fungal Genet. Biol. (2004); 41(11):973-981.

Los clones positivos en la PCR se evaluaron a continuación para la producción de celulasas en matraces. Algunas esporas de cada clon se utilizaron para inocular 50 ml de medio PD Broth (Difco). Los matraces se incubaron 72 horas a 30 °C con agitación a 150 rpm. Después de 72 horas este precultivo sirve para inocular 30 % de un medio de producción de celulasas que tiene la siguiente composición: lactosa (20 g/l) celulosa Solka-Floc (20 g/l), peptona (5 g/l),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (15 g/l),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5 g/l),  $\text{CaCl}_2$  (0,6 g/l),  $\text{MgSO}_4$  (0,6 g/l),  $\text{FeSO}_4$  (0,005 g/l),  $\text{MnSO}_4$  (0,0014 g/l),  $\text{ZnSO}_4$  (0,0014 g/l),  $\text{CoCl}_2$  (0,0037 g/l), ácido maleico (11,6 g/l), Tris (12,1 g/l) y NaOH (2,08 g/l).

Los cultivos se incubaron a 30 °C a 150 rev/min de agitación. Después de 5 días los cultivos se centrifugaron y la concentración de proteínas del sobrenadante se mide por el método de Bradford. La actividad beta-glucosidasa de los sobrenadantes se midió por hidrólisis del sustrato cromóforo p-nitrofenil-beta-D-glucósido (pNPG) en las siguientes condiciones:

- 50 mM de tampón citrato a pH 4,8
- 5 m; de pNPG
- 10  $\mu$ l de muestra
- incubación a 50 °C durante 30 min.

La reacción se detuvo mediante la adición de 100  $\mu$ l de carbonato de sodio al 2 %. La cantidad de para-nitrofenol liberada por la hidrólisis de pNPG se midió mediante la medición de la absorbancia a 410 nm y se comparó con un patrón de para-nitrofenol. La reacción fue lineal desde 25 hasta 400  $\mu$ m de para-nitrofenol.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos para cada variante (un ejemplo por variante) en comparación con las actividades medidas con una cepa no transformada (CL847) y con una cepa transformada con la beta-glucosidasa nativa de *T. reesei* (CL847-bgl1+).

La Tabla 6 presenta los factores de mejora con respecto a las cepas de partida CL847 (Durand et al, Enzyme Microb. Technol., 1988; 10:341-346) y CL847-bgl1+, que sobreexpresan la beta-glucosidasa *bgl1* nativa de *T. reesei*.

**TABLA 6: Factores de aumento de la actividad específica beta-glucosidasa respecto a la referencia (datos de la Figura 2.)**

<u>Clones</u>	<u>Factor de aumento</u>
CL847	-
CL847-bgl1+	2,9
100B11	26,2
164A2	22,3
115E1	12,1

**EJEMPLO 6: Actividad enzimática de una composición de celulasa producido por un transformante De *T. reesei* expresando mejorada beta-glucosidasa**

La variante 100B11 del Ejemplo 5 se utilizó para producir celulastas en un fermentador de 2L.

La producción de celulastas se lleva a cabo en un fermentador agitado mecánicamente. El medio tiene la siguiente composición: KOH (1,66 g/l), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % (2 ml/l), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,8 (g/l), MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (0,6 g/l), CaCl<sub>2</sub> (0,6 g/l), MnSO<sub>4</sub> 3,2 (mg/l), ZnSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (2,8 mg/l), CoCl<sub>2</sub> (4,0 mg/l), FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (10 mg/l), macerado de maíz (*Corn Steep*) (1,2 g/l), antiespumante (0,5 ml/l).

El fermentador que contiene 1,75 l de medio mineral y 70 g de lactosa se esteriliza a 120 °C y luego se siembra con 0,25 l de un pre-cultivo líquido de la cepa de *Trichoderma reesei* CL847. La mitad del pre-cultivo, complementado con ftalato de potasio 5 g/l para el control de las variaciones del pH, es idéntico al del fermentador. El crecimiento del hongo en precultivo se hace en lactosa, a una concentración de 30 g/l. El crecimiento del inóculo tiene una duración de 2 a 3 días y se realiza entre 27 y 30 °C en una mesa vibratoria.

Después de 46 horas de crecimiento, el sustrato inicial del fermentador se agota y la solución de lactosa a 250 g/l se inyecta continuamente a un caudal de 4,5 ml/h hasta 142 horas.

La temperatura se regula a 27 °C durante la fase de crecimiento de la biomasa, a continuación, a 25 °C hasta el final del cultivo. El pH se regula a 5 durante la fase de crecimiento y después a 4 hasta el final del cultivo mediante la adición de una solución de amoníaco que proporciona el nitrógeno necesario para la síntesis de proteínas excretadas. El contenido de oxígeno disuelto se mantiene por encima del 15 al 20 % ajustando la aireación y la agitación.

La producción de enzimas se controla mediante el ensayo de proteínas extracelulares por el método de Folin (Lowry Biol. Chem. 1951; 193:265-275), después de la separación del micelio por filtración o centrifugación. La actividad beta-glucosidasa fue medida según el método descrito anteriormente (véase el Ejemplo 5) con el sustrato pNPG. La actividad FPasa en papel de filtro se midió de acuerdo con el método recomendado por Mandels, et al. *Biotechnology for Biofuels*, 2009; 2:21. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

**TABLA 7**

	Cepas utilizadas para la producción		
	<b>CL847</b>	<b>CL847-bgl1+</b>	<b>100B11</b>
Actividad específica beta-glucosidasa (UI/mg) de la mezcla de producto celulolítico	10055	45176	119677
Actividad específica FPasa (UI/mg) de la mezcla de producto celulolítico	0,5	0,4	0,65
Factor de aumento de la actividad beta-glucosidasa respecto a la cepa CL847	-	4,5	11,9

**EJEMPLO 7: Eficacia hidrolítica en un sustrato lignocelulósico pretratado de la mezcla celulolítica producida por un transformante de *T. reesei* que expresa una beta-glucosidasa mejorada**

Las mezclas celulolíticas producidas por la cepa de referencia CL847 y por el transformante que expresa la beta-glucosidasa mejorada 100B11 del Ejemplo 6 se utilizaron para la hidrólisis de la paja de trigo pretratada por explosión de vapor en condiciones ácidas. Los hidrolizados se llevan a cabo en un biorreactor Bio-Laffite con camisa doble, agitado con dos tipos de agitadores del tipo "ancla de marina" en las siguientes condiciones experimentales:

- sustrato lignocelulósico diluido hasta 10 % de materia seca
- volumen de reacción 2 l
- tampón acetato 1 M pH 4,8 (pH comprobado diariamente)

– temperatura 48 °C

5 El conjunto se impregna durante 12 h a 300 rev/min antes de la adición de 20 mg/g de materia seca de la enzima y el paso a 500 rev/min. Se toman muestras a las 0h, 5h, 24h, 48h y 72h después de la adición de las enzimas. Las enzimas se inactivan por pasaje de la muestra 10 minutos en un baño de agua hirviendo. La muestra se centrifugó a continuación y el sobrenadante se filtró antes de la determinación de la glucosa mediante HPLC.

10 Los resultados se muestran en la Figura 3. Después de 24 h, la mezcla enzimática que contiene la beta-glucosidasa mejorada producida por el transformante 100B11 ha liberado dos veces más de glucosa que la mezcla enzimática producida por la cepa de referencia (CL847). El rendimiento máximo se alcanza en 24 h para la mezcla de la cepa 100B11. A las 72h todavía no se alcanza este rendimiento para la mezcla enzimática de referencia (CL847).

15 La mezcla enzimática producida por el transformante 100B11, por tanto, tiene una eficiencia notablemente superior a la de la mezcla enzimática de referencia (CL847) para la misma dosis de enzima. Esta propiedad se traduce en un mayor rendimiento y productividad para una hidrólisis más completa del sustrato. Opcionalmente permitiría reducir la dosis de enzima a ser utilizada para obtener un resultado equivalente en la hidrólisis. Dado el coste de las enzimas celulolíticas, que representa una parte importante del precio de coste del bioetanol lignocelulósico, cualquier reducción significativa de la cantidad de enzimas a utilizar se puede considerar como una mejora importante del procedimiento.

20

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> IFP PROTEUS

25

<120> VARIANTES DE LA BETA-GLUCOSIDASA CON ACTIVIDAD MEJORADA Y SUS USOS

<130> BFF080376

30

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.3

35

<210> 1

<211> 2235

<212> ADN

<213> *Trichoderma reesei*

<400> 1

ES 2 612 744 T3

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac 60  
agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg 120  
ggaaccgctg acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggctc 180  
ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaaacac atctccggcc 240  
tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcgggtg tcgatactcg 300  
acaggcagca cagcctttac gccgggctt caagcggcct cgacgtggga tgtcaatttg 360  
atccgcgaac gtggacagtt catcgggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata 420  
cttggctctg tggctgggcc gctgggaaag actccgcagg gcggtcgcaa ctgggagggc 480  
ttcgggtgctg atccatatct cacgggcatt gccatgggtc aaaccatcaa cggcatccag 540  
tcggtaggcg tgcaggcgac agcgaagcac tatactctca acgagcagga gctcaatcga 600  
gaaaccattt cgagcaacct agatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt 660  
gccgacgcgg ttcaggccaa tgctcgttct gtcattgtct cgtacaacaa ggtcaatacc 720  
acctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctgggggtc 780  
ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct 840  
gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctgggggtcca 900  
gctctcacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg 960  
actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc 1020  
aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccagggac 1080  
ggcatcgttc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140  
gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgc ctcgtgcaac 1200  
gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat 1260  
ccgtacttcg tcgcgcccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag 1320  
gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcct ctgcagcaag aggaaaggac 1380  
gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcaccgt ggagggcaac 1440

ES 2 612 744 T3

gCGGGCGATC GCAACAACCT GGATCCGTGG CACAACGGCA ATGCCCTGGT CCAGGCGGTG 1500  
 GCCGGTGCCA ACAGCAACGT CATTGTTGTT GTCCACTCCG TTGGCGCCAT CATTCTGGAG 1560  
 CAGATTCTTG CTCTCCGCA GGTCAAGGCC GTTGTCTGGG CGGGTCTTCC TTCTCAGGAG 1620  
 AGCGGCAATG CGCTCGTCGA CGTGCTGTGG GGAGATGTCA GCCCTTCTGG CAAGCTGGTG 1680  
 TACACCATTG CGAAGAGCCC CAATGACTAT AACACTCGCA TCGTTTCCGG CGGCAGTGAC 1740  
 AGCTTCAGCG AGGGACTGTT CATCGACTAT AAGCACTTCG ACGACGCCAA TATCACGCCG 1800  
 CGGTACGAGT TCGGCTATGG ACTGTCTTAC ACCAAGTTCA ACTACTCACG CCTCTCCGTC 1860  
 TTGTCGACCG CCAAGTCTGG TCCTGCGACT GGGGCCGTTG TGCCGGGAGG CCCGAGTGAT 1920  
 CTGTTCCAGA ATGTCGCGAC AGTCACCGTT GACATCGCAA ACTCTGGCCA AGTGACTGGT 1980  
 GCCGAGGTAG CCCAGCTGTA CATCACCTAC CCACTTTCAG CACCCAGGAC CCCTCCGAAG 2040  
 CAGCTGCGAG GCTTTGCCAA GCTGAACCTC ACGCCTGGTC AGAGCGGAAC AGCAACGTTT 2100  
 AACATCCGAC GACGAGATCT CAGCTACTGG GACACGGCTT CGCAGAAATG GGTGGTGCCG 2160  
 TCGGGGTCGT TTGGCATCAG CGTGGGAGCG AGCAGCCGGG ATATCAGGCT GACGAGCACT 2220  
 CTGTCGGTAG CGTAG 2235

<210> 2  
 <211> 744  
 <212> PRT  
 <213> *Trichoderma reesei*  
 <400> 2

5

ES 2 612 744 T3

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



ES 2 612 744 T3

Gly Glu Glu Val Lys Ala Ser Gly Ile His Val Ile Leu Gly Pro Val  
130 135 140

Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly  
145 150 155 160

Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Gly Gln Thr Ile  
165 170 175

Asn Gly Ile Gln Ser Val Gly Val Gln Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile  
180 185 190

Leu Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asn Pro Asp  
195 200 205

Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Thr Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val  
210 215 220

Gln Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Val Asn Thr  
225 230 235 240

Thr Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp  
245 250 255

Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His  
260 265 270

Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly  
275 280 285

Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn  
290 295 300

Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val  
305 310 315 320

Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly  
325 330 335

Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr  
340 345 350

Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp  
355 360 365

Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly  
370 375 380

Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn  
385 390 395 400

ES 2 612 744 T3

Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly  
 405 410 415  
 Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr  
 420 425 430  
 Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn  
 435 440 445  
 Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val  
 450 455 460  
 Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu  
 485 490 495  
 Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His  
 500 505 510  
 Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val  
 515 520 525  
 Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala  
 530 535 540  
 Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser  
 565 570 575  
 Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His  
 580 585 590  
 Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu  
 595 600 605  
 Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala  
 610 615 620  
 Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp  
 625 630 635 640  
 Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly  
 645 650 655  
 Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser  
 660 665 670

ES 2 612 744 T3

Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu  
675 680 685

Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg  
690 695 700

Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro  
705 710 715 720

Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg  
725 730 735

Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala  
740

<210> 3  
<211> 2235  
<212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> clon 10H7

<400> 3

atgCGttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac 60  
agtcactcaa catcgggggc ctcggtgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg 120  
ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc 180  
ggcatcgtga geggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaaacac atctccggcc 240  
tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcggtat ccgattcggc 300  
acaggcagca cagcctttac gccgggcggt caagcggcct cgacgtggga taccgagttg 360  
atgCGccagc gtggagagta cctgggtgcc gaggccaagg gctgcgggat tcatgtcctg 420  
cttggctcctg tggctggggc cctgggaaag atcccgcacg gcggtcgcaa ctgggagggc 480  
ttcggtagcg atccatatct cgccggcatt gccatggccg agacaatcga gggcctgcag 540  
tcggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatcgta acgagcagga gctcaatcga 600  
gaaaccattt cgagcgacgt cgatgaccga actatgcatg agctgtatct gtggccattt 660  
gccgacgcgg ttcacgcaa tgtcgttct gtcatgtgct cgtacaaca ggtcaatacc 720  
acctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctggggttc 780  
ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct 840  
gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctggggcca 900  
gctctacca atgCGgtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg 960  
actcgtatcc tcgcccatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc 1020  
aacatcagca gaaatgtca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccaggac 1080  
ggcatcgttc tgctcaagaa tgacccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140  
gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactgcc ctcgtgcaac 1200

ES 2 612 744 T3

gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atggggttggg gttccggcgc cgtcaactat 1260  
 ccgtacttcg tcgcgcccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag 1320  
 gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcac ctgcagcaag aggaaaggac 1380  
 gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac 1440  
 gcgggcgatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg 1500  
 gccggtgcc aacagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag 1560  
 cagattcttg ctcttcgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620  
 agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg 1680  
 tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac 1740  
 agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa taccacgccg 1800  
 cggtagcagt tcggctatgg actgtcttac accaagtcca actactcacg cctctccgtc 1860  
 ttgtcgaccg ccaagtctgg tcctgcgact ggggccggtg tgccgggagg cccgagtgat 1920  
 ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccgtt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980  
 gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccatcttcag caccaggac ccctccgaag 2040  
 cagctgcgag gctttgcaa gctgaacctc acgcctggtc agagcggaac agcaacgttc 2100  
 aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg 2160  
 tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220  
 ctgtcggtag cgtag 2235

5 <210> 4  
 <211> 744  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> clon 10H7  
 <400> 4

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

ES 2 612 744 T3

Ser Lys Ile Ser Tyr Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly  
85 90 95

Ile Arg Phe Gly Thr Gly Ser Thr Ala Phe Thr Pro Gly Val Gln Ala  
100 105 110

Ala Ser Thr Trp Asp Thr Glu Leu Met Arg Gln Arg Gly Glu Tyr Leu  
115 120 125

Gly Ala Glu Ala Lys Gly Cys Gly Ile His Val Leu Leu Gly Pro Val  
130 135 140

Ala Gly Ala Leu Gly Lys Ile Pro His Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly  
145 150 155 160

Phe Gly Thr Asp Pro Tyr Leu Ala Gly Ile Ala Met Ala Glu Thr Ile  
165 170 175

Glu Gly Leu Gln Ser Ala Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile  
180 185 190

Val Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asp Val Asp  
195 200 205

Asp Arg Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val  
210 215 220

His Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Val Asn Thr  
225 230 235 240

Thr Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp  
245 250 255

Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His  
260 265 270

Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly  
275 280 285

Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn  
290 295 300

Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val  
305 310 315 320

Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly  
325 330 335

Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr  
340 345 350

ES 2 612 744 T3

Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp  
 355 360 365  
 Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly  
 370 375 380  
 Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn  
 385 390 395 400  
 Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly  
 405 410 415  
 Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr  
 420 425 430  
 Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn  
 435 440 445  
 Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val  
 450 455 460  
 Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu  
 485 490 495  
 Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His  
 500 505 510  
 Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val  
 515 520 525  
 Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala  
 530 535 540  
 Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser  
 565 570 575  
 Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His  
 580 585 590  
 Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu  
 595 600 605  
 Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala  
 610 615 620

ES 2 612 744 T3

Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp  
 625 630 635 640  
 Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly  
 645 650 655  
 Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser  
 660 665 670  
 Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu  
 675 680 685  
 Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg  
 690 695 700  
 Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro  
 705 710 715 720  
 Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg  
 725 730 735  
 Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala  
 740

5 <210> 5  
 <211> 2232  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> clon 59B8  
 <400> 5

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac 60  
 agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg 120  
 ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc 180  
 ggcacgtgta gcggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaacac atctccggcc 240  
 tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcggat ccgattcggc 300  
 acaggcagca cagcctttac gccgggcggt caagcggcct cgacgtggga taccgagttg 360  
 atgcgccagc gtggagagta cctgggtgcc gaggccaagg gctgcgggat tcatgtcctg 420  
 cttggtcctg tggctggggc cctgggaaag atcccgcacg gcggtcgcaa ctgggagggc 480  
 ttcggtaccg atccatatct cgccggcatt gccatggccg agacaatcga gggcctgcag 540  
 tcggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatcgtca acgagcagga gctcaatcga 600  
 gaaaccattt cgagcgacgt cgatgaccga actatgcatg agctgtatct gtggccattt 660  
 gccgacgagg ttcacgcaa tgtcgttct gtcatgtgct cgtacaaca ggtcaatacc 720  
 acctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctggggttc 780  
 ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct 840

ES 2 612 744 T3

```

gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctgggggtcca 900
gctctcacca atgctgtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg 960
actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc 1020
aacatcagca gaaatggtca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccagggac 1080
ggcatcgttc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140
gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgccca gaaactcggc ctcgtgcaac 1200
gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat 1260
ccgtacttcg tcgcccccta cgatgccctc aagaccagag cgtcttcgca gggcacccag 1320
gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcac ctgcagcaag aggaaaggac 1380
gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac 1440
gcgggcgatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcgggtg 1500
gccggtgccca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag 1560
cagattcttg ctcttcgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620
agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg 1680
tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgcga tcgtttccgg cggcagtgac 1740
agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcca gatcgagccg 1800
cggtagcagt tcggcttcgg actgtcttac accgagttca cctacgccga cctctccgtc 1860
acctcgaccg tcaccgccgg tcctgcgagc ggggagacaa tcccgggagg cgccgccgat 1920
ctgtgggaga cagtcgac agtcaccgcc agcatcacca actctggcga ggtggagggt 1980
gccgaggtag cccagctgta catcacctg ccatctgccg caccagcac ccctccgaag 2040
cagctgcgag gctttgcaa gctgaagctc gagcctgggt ccagcggagt cgcaacgttc 2100
aatctgcgac gacgagatct cagctactgg gacgccggcc gagccagtg ggtggtgccg 2160
gccggggagt ttaccgtcag cgtgggagcg agcagccggg atgtcaggct gacgggcagc 2220
ctgaccgcct ag 2232

```

5 <210> 6  
 <211> 743  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> clon 59B8

<400> 6

```

Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Gly Pro Phe
 1           5           10           15
Ala Arg Ala Asp Ser His Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val
 20           25           30

```



ES 2 612 744 T3

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

ES 2 612 744 T3

Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val  
 305 310 315 320

Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly  
 325 330 335

Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr  
 340 345 350

Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp  
 355 360 365

Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly  
 370 375 380

Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn  
 385 390 395 400

Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly  
 405 410 415

Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Leu Lys Thr  
 420 425 430

Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn  
 435 440 445

Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val  
 450 455 460

Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn  
 465 470 475 480

Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu  
 485 490 495

Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His  
 500 505 510

Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val  
 515 520 525

Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala  
 530 535 540

Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val  
 545 550 555 560

Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser  
 565 570 575

ES 2 612 744 T3

Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His  
 580 585 590

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

Ser Tyr Thr Glu Phe Thr Tyr Ala Asp Leu Ser Val Thr Ser Thr Val  
 610 615 620

Thr Ala Gly Pro Ala Ser Gly Glu Thr Ile Pro Gly Gly Ala Ala Asp  
 625 630 635 640

Leu Trp Glu Thr Val Ala Thr Val Thr Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly  
 645 650 655

Glu Val Glu Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Leu Pro Ser  
 660 665 670

Ala Ala Pro Ser Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu  
 675 680 685

Lys Leu Glu Pro Gly Ala Ser Gly Val Ala Thr Phe Asn Leu Arg Arg  
 690 695 700

Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Ala Gly Arg Gly Gln Trp Val Val Pro  
 705 710 715 720

Ala Gly Glu Phe Thr Val Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Val Arg  
 725 730 735

Leu Thr Gly Ser Leu Thr Ala  
 740

<210> 7  
 <211> 2235  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> clon 164A2

<400> 7

atgCGttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac 60  
 agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg 120  
 ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc 180  
 ggcacatcgtga gCGgtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaacac atctccggcc 240  
 tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcggtgt tcgatactcg 300  
 acaggcagca cagcctttac gccgggcggt caagcggcct cgacgtggga tgtcaatttg 360  
 atccgcgaac gtggacagtt catcggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata 420  
 cttggtcctg tggctgggCC gctgggaaag actccgcagg gcggtcgcaa ctgggagggc 480

ES 2 612 744 T3

ttcggtgtcg atccatatct cacgggcatt gccatgggtc aaaccatcaa cggcatccag 540  
 tcggtaggcg tgcaggcgac agcgaagcac tatatcctca acgagcagga gctcaatcga 600  
 gaaaccattt cgagcaacce agatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt 660  
 gccgacgcgg ttcacgcaa tgctcgttct gtcatgtgtc cgtacaacaa gatcaatggc 720  
 agctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctggggttc 780  
 ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct 840  
 gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctggggcca 900  
 gctctcacca atgcbgtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg 960  
 actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc 1020  
 aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcaggccaat tgccagggac 1080  
 ggcatcgttc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgcccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140  
 gccgtcgttg gatctgcccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcggc ctcgtgcaac 1200  
 gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat 1260  
 ccgtacttgc tcgcbcccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag 1320  
 gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcat ctgcagcaag aggaaaggac 1380  
 gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcaccgt ggaggccaac 1440  
 gcgggcbgatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg 1500  
 gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag 1560  
 cagattcttg ctcttcgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620  
 agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg 1680  
 tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcga tcgtttccgg cggcagtga 1740  
 agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacgccg 1800  
 cggtacgagt tcggctatgg actgtcttac accaagttca actactcacg cctctccgtc 1860  
 ttgtcgaccg ccaagtctgg tcctgcgact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat 1920  
 ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccggt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980  
 gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccatcttcag caccaggac cctccgaag 2040  
 cagctgcgag gctttgcaa gctgaaccte acgcctggtc agagcggaac agcaacgttc 2100  
 aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg 2160  
 tcggggctgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220  
 ctgtcggtag cgtag 2235

<210> 8  
 <211> 744  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> clon 164A2

10

<400> 8

ES 2 612 744 T3

Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Gly Pro Phe  
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ser His Ser Thr Ser Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val  
20 25 30

Val Pro Pro Ala Gly Thr Pro Trp Gly Thr Ala Tyr Asp Lys Ala Lys  
35 40 45

Ala Ala Leu Ala Lys Leu Asn Leu Gln Asp Lys Val Gly Ile Val Ser  
50 55 60

Gly Val Gly Trp Asn Gly Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Ser Pro Ala  
65 70 75 80

Ser Lys Ile Ser Tyr Pro Ser Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly  
85 90 95

Val Arg Tyr Ser Thr Gly Ser Thr Ala Phe Thr Pro Gly Val Gln Ala  
100 105 110

Ala Ser Thr Trp Asp Val Asn Leu Ile Arg Glu Arg Gly Gln Phe Ile  
115 120 125

Gly Glu Glu Val Lys Ala Ser Gly Ile His Val Ile Leu Gly Pro Val  
130 135 140

Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly  
145 150 155 160

Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Gly Gln Thr Ile  
165 170 175

Asn Gly Ile Gln Ser Val Gly Val Gln Ala Thr Ala Lys His Tyr Ile  
180 185 190

Leu Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asn Pro Asp  
195 200 205

Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Thr Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val  
210 215 220

His Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile Asn Gly  
225 230 235 240

Ser Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp  
245 250 255

ES 2 612 744 T3

Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His  
 260 265 270

Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly  
 275 280 285

Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn  
 290 295 300

Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val  
 305 310 315 320

Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly  
 325 330 335

Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr  
 340 345 350

Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp  
 355 360 365

Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly  
 370 375 380

Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn  
 385 390 395 400

Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly  
 405 410 415

Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr  
 420 425 430

Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn  
 435 440 445

Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val  
 450 455 460

Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn  
 465 470 475 480

Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu  
 485 490 495

Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His  
 500 505 510

Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val  
 515 520 525

ES 2 612 744 T3

Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala  
 530 535 540

Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val  
 545 550 555

Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser  
 565 570 575

Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His  
 580 585 590

Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu  
 595 600 605

Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala  
 610 615 620

Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp  
 625 630 635 640

Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly  
 645 650 655

Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser  
 660 665 670

Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu  
 675 680 685

Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg  
 690 695 700

Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro  
 705 710 715 720

Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg  
 725 730 735

Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala  
 740

5 <210> 9  
 <211> 2235  
 <212> ADN  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> clon 100B11

<400> 9

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac 60  
 agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg 120

ES 2 612 744 T3

ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc 180  
 ggcacgcgtga gcggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaaacac atctccggcc 240  
 tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcgggat ccgattcggc 300  
 acaggcagca cagcctttac gccgggcggt caagcggcct cgacgtggga taccgagttg 360  
 atgcgccagc gtggagagta cctgggtgcc gaggccaagg gctgcgggat tcatgtcctg 420  
 ctgggtcctg tggctgggcc gctgggaaag actccgcagg gcggtcgsaa ctgggagggc 480  
 ttcggtgtcg atccatatct cacgggcatt gccatggccg agacaatcga gggcctgcag 540  
 tcggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatcgtca acgagcagga gctcaatcga 600  
 gaaaccattt cgagcgacgt cgatgaccga actatgcatg agctgtatct gtggccattt 660  
 gccgacgcgg ttcaggccaa tgtcgttctt gtcatgtgct cgtacaacaa gatcaatggc 720  
 agctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctgggggtc 780  
 ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct 840  
 gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctgggggtcca 900  
 gctctcacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg 960  
 actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc 1020  
 aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccaggggac 1080  
 ggcacgcgtt tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140  
 gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgcc ctcgtgcaac 1200  
 gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat 1260  
 ccgtacttcg tcgcgcccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcacccag 1320  
 gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcag ctgcagcaag aggaaaggac 1380  
 gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcaccgt ggagggcaac 1440  
 gcgggcgatc gacaacaact ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcgggtg 1500  
 gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag 1560  
 cagattcttg ctcttccgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620  
 agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctgggtg 1680  
 tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac 1740  
 agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacgccg 1800  
 cggtagcagt tcggctatgg actgtcttac accaagtcca actactcacg cctctccgtc 1860  
 ttttcgaccg ccaagtctgg tcctgcgact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat 1920  
 ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccggt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980  
 gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccatcttcag caccaggac ccctccgaag 2040  
 cagctgcgag gctttgcaa gctgaacctc acgcctggtc agagcggaac agcaacgttc 2100  
 aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg 2160  
 tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220  
 ctgtcggtag cgtag 2235



ES 2 612 744 T3

<210> 10  
 <211> 744  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> clon 100B11

10

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

ES 2 612 744 T3

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

ES 2 612 744 T3

Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu  
 485 490 495

Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His  
 500 505 510 515

Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val  
 515 520 525

Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala  
 530 535 540

Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val  
 545 550 555 560

Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser  
 565 570 575

Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His  
 580 585 590

Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu  
 595 600 605

Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Phe Ser Thr Ala  
 610 615 620

Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp  
 625 630 635 640

Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly  
 645 650 655

Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser  
 660 665 670

Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu  
 675 680 685

Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg  
 690 695 700

Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro  
 705 710 715 720

Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg  
 725 730 735

Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala  
 740

<210> 11  
 <211> 2235  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> clon 115E1

<400> 11

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac 60  
 agtcaactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctccctgcagg gactccatgg 120  
 ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc 180  
 ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaaacac atctccggcc 240  
 tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcggtat ccgattcggc 300  
 acaggcagca cagcctttac gccgggcggt caagcggcct cgacgtggga tgtcaatttg 360  
 atccgcgaac gtggacagtt catcgggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata 420  
 cttggtcctg tggctgggccc gctgggaaag atcccgcacg gcggtcgcaa ctgggagggc 480  
 ttcggtgtcg atccatatct cacgggcatt gccatggccg agacaatcga gggcctgcag 540  
 tcggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatcctca acgagcagga gctcaatcga 600  
 gaaaccattt cgagcaacct agatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt 660  
 gccgacgcgg ttcacgcaa tgtcgettct gtcattgtct cgtacaacaa gatcaatggc 720  
 agctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctgggggttc 780  
 ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct 840  
 gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctgggggtcca 900  
 gctctacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatgggtg 960  
 actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc 1020  
 aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccaggggac 1080  
 ggcatcgttc tgetcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140  
 gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgc ctcgtgcaac 1200  
 gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat 1260  
 ccgtacttcg tcgcgcccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag 1320  
 gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcac ctgcagcaag aggaaaggac 1380  
 gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcaccgt ggagggcaac 1440  
 gcgggcatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcgggtg 1500  
 gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag 1560  
 cagattcttg ctcttccgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620  
 agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctgggtg 1680  
 tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcga tcgtttccgg cggcagtgac 1740  
 agcttcagcg agggactggt catcgaactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacgccg 1800

5

ES 2 612 744 T3

cggtagcaggt tcggctatgg actgtcttac accaagttca actactcacg cctctccgtc 1860  
 ttgtcgaccg ccaagtctgg tcctgcgact ggggccggtg tgccgggagg cccgagtgat 1920  
 ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccggt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980  
 gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccatcttcag caccagggac cctccgaag 2040  
 cagctgcgag gctttgcca gctgaacctc acgcctggtc agagcggaac agcaacgttc 2100  
 aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg 2160  
 tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220  
 ctgtcggtag cgtag 2235

<210> 12  
 <211> 744  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> clon 115E1

<400> 12

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

ES 2 612 744 T3

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

ES 2 612 744 T3

Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn  
 435 440 445  
 Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val  
 450 455 460  
 Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu  
 485 490 495  
 Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His  
 500 505 510  
 Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val  
 515 520 525  
 Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala  
 530 535 540  
 Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val  
 545 550 555 560  
 Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser  
 565 570 575  
 Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His  
 580 585 590  
 Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu  
 595 600 605  
 Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala  
 610 615 620  
 Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp  
 625 630 635 640  
 Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly  
 645 650 655  
 Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser  
 660 665 670  
 Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu  
 675 680 685  
 Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg  
 690 695 700

ES 2 612 744 T3

Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro  
705 710 715 720

Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg  
725 730 735

Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala  
740

5 <210> 13  
<211> 2259  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> clon 149G7

<400> 13



ES 2 612 744 T3

atgcgttacc	gaacagcagc	tgcgctggca	cttgccactg	ggccctttgc	tagggcagac	60
agtcactcaa	catcgggggc	ctcggctgag	gcagagacaa	gcgagaagca	ggccccgacag	120
gccggcagcg	gcttcgccgc	ctgggacgcc	gcgtacagcc	aggcgagcac	cgcattgagc	180
aagctcagcc	agcaagataa	ggtcaacatc	gtgaccggtg	tcggctggaa	caagggtcct	240
tgcgttggaa	acacaccggc	catcgccagc	atcggctatc	cacagctatg	ccttcaagac	300
ggacccctcg	gtatccgatt	cggcacaggc	agcacagcct	ttacgccggg	cgttcaagcg	360
gcctcgacgt	gggatgtcga	gttgatccgc	cagcgtgggg	tctacctggg	tgccgaggcc	420
cgaggcgctg	gggtccatgt	cctgcttggg	cctgtggctg	ggccgctggg	aaagactccg	480
cagggcggtc	gcaactggga	gggcttcggg	gtcgatccat	atctcacggg	cattgccatg	540
agcgagacaa	tcgagggcat	ccagtcgaac	ggcgtgcagg	cgtagcga	gcactatatac	600
ctcaacgagc	aggagctcaa	tcgagaaacc	atttcgagca	accagatga	ccgaactctc	660
catgagctgt	atacttggcc	atttgccgac	gcggttcacg	ccaatgtcgc	ttctgtcatg	720
tgctcgtaca	acaagatcaa	tggcagctgg	gcctgcgagg	atcagtacac	gctgcagact	780
gtgctgaaag	accagctggg	gttcccaggc	tatgtcatga	cggactggaa	cgcacagcac	840
acgactgtcc	aaagcgcgaa	ttctgggctt	gacatgtcaa	tgcttggcac	agacttcaac	900
ggtaacaatc	ggctctgggg	tccagctctc	accaatgcgg	taaatagcaa	tcaggtcccc	960
acgagcagag	tcgacgatata	ggtgactcgt	atcctcgccg	catggtactt	gacaggccag	1020
gaccaggcag	gctatccgtc	gttcaacatc	agcagaaatg	ttcaaggaaa	ccacaagacc	1080
aatgtcaggg	caattgccag	ggacggcatc	gttctgtctca	agaatgacgc	caacatcctg	1140
ccgctcaaga	agccccgctag	cattgccgtc	gttggatctg	ccgcaatcat	tggttaaccac	1200
gccagaaact	cgccctcgtg	caacgacaaa	ggctgcgacg	acggggcctt	gggcatgggt	1260
tggggttccg	gcgccgtcaa	ctatccgtac	ttcgtcgcgc	cctacgatgc	catcaatacc	1320
agagcgtctt	cgcagggcac	ccaggttacc	ttgagcaaca	ccgacaacac	gtcctcaggc	1380
gcatctgcag	caagaggaaa	ggacgtcgcc	atcgtcttca	tcaccgccga	ctcgggtgaa	1440

ES 2 612 744 T3

ggctacatca ccgtggaggg caacgcgggc gatcgcaaca acctggatcc gtggcacaac 1500  
 ggcaatgccc tgggccaggc ggtggccggt gccaacagca acgtcattgt tgttgtccac 1560  
 tccgttggcg ccatcattct ggagcagatt cttgctcttc cgcagggtcaa ggccgttgtc 1620  
 tgggcggggtc ttccttctca ggagagcggc aatgcgctcg tcgacgtgct gtggggagat 1680  
 gtcagccctt ctggcaagct ggtgtacacc attgcgaaga gccccaatga ctataaact 1740  
 cgcacgttt ccggcggcag tgacagcttc agcgagggac tgttcatcga ctataagcac 1800  
 ttcgacgacg ccaatatcac gccgcggtac gagttcggct atggactgtc ttacaccaag 1860  
 ttcaactact cacgcctctc cgtcttgtcg accgccaagt ctggtcctgc gactggggcc 1920  
 gttgtgccgg gaggccccgag tgatctgttc cagaatgtcg cgacagtcac cgttgacatc 1980  
 gcaaactctg gccaaagtac tggtgccgag gtagcccagc tgtacatcac ctaccatct 2040  
 tcagcaccca ggaccctcc gaagcagctg cgaggctttg ccaagctgaa cctcacgcct 2100  
 ggtcagagcg gaacagcaac gttcaacatc cgacgacgag atctcagcta ctgggacacg 2160  
 gcttcgcaga aatgggtggt gccgtcgggg tcgtttggca tcagcgtggg agcgagcagc 2220  
 cgggatatca ggctgacgag cactctgtcg gtagcgtag 2259

<210> 14  
 <211> 752  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> clon 149G7

10

<400> 14

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

ES 2 612 744 T3

Ala Phe Thr Pro Gly Val Gln Ala Ala Ser Thr Trp Asp Val Glu Leu  
115 120 125

Ile Arg Gln Arg Gly Val Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Arg Gly Val Gly  
130 135 140

Val His Val Leu Leu Gly Pro Val Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro  
145 150 155 160

Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr  
165 170 175

Gly Ile Ala Met Ser Glu Thr Ile Glu Gly Ile Gln Ser Asn Gly Val  
180 185 190

Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile Leu Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg  
195 200 205

Glu Thr Ile Ser Ser Asn Pro Asp Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr  
210 215 220

Thr Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val His Ala Asn Val Ala Ser Val Met  
225 230 235 240

Cys Ser Tyr Asn Lys Ile Asn Gly Ser Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr  
245 250 255

Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val  
260 265 270

Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser  
275 280 285

Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg  
290 295 300

Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro  
305 310 315 320

Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr  
325 330 335

Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg  
340 345 350

Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp  
355 360 365

Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys  
370 375 380

ES 2 612 744 T3

Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His  
 385 390 395 400  
 Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala  
 405 410 415  
 Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val  
 420 425 430  
 Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln  
 435 440 445  
 Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala  
 450 455 460  
 Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu  
 465 470 475 480  
 Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp  
 485 490 495  
 Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn  
 500 505 510  
 Ser Asn Val Ile Val Val Val His Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu  
 515 520 525  
 Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu  
 530 535 540  
 Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp  
 545 550 555 560  
 Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn  
 565 570 575  
 Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu  
 580 585 590  
 Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro  
 595 600 605  
 Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser  
 610 615 620  
 Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala  
 625 630 635 640  
 Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val  
 645 650 655

ES 2 612 744 T3

Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala  
660 665 670

Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys  
675 680 685

Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly  
690 695 700

Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr  
705 710 715 720

Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val  
725 730 735

Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala  
740 745 750

- <210> 15
- <211> 2181
- <212> ADN
- <213> *Chaetomium globosum*
- <400> 15

5

ES 2 612 744 T3

atgacgacgc	tccgcaactt	tgcgctgctc	gcagcggcgg	tgcttgcgcg	ggtcgaggcc	60
ctcgaggccg	ccgactgggc	tgcggctgag	gcctcagcca	aaaccgcact	ggcaaagatg	120
tcacaacaag	acaaaatcag	cattgtgacg	ggcatcggct	gggacaaggg	tccctgtgtc	180
ggcaacacgg	ccgccatcaa	ctcgatcaac	tacccgcagc	tctgcctaca	ggacggcccc	240
ctcgggatcc	gcttcggcac	cggctcgacg	gccttcaccc	cgggcgtcca	agccgcctcg	300
acatgggata	ccgagctgat	gcgccagcgc	ggcgagtacc	tcggggccga	ggccaagggg	360
tgcggcatcc	acgtgttgct	gggccccgtg	gccggggcac	tgggcaagat	cccgcacggc	420
gggcgcaact	gggaaggatt	cgggacggac	ccgtacctgg	cgggcatcgc	catggccgag	480
acgatcgagg	ggctgcagtc	ggcgggggtg	caggcgtgcg	ccaagcacta	catcgtcaac	540
gagcaggagc	tcaaccgcga	gaccatcagc	agcgacgtcg	acgaccgcac	catgcacgag	600
ctgtacctgt	ggcccttcgc	cgacgccgtg	cacgccaacg	tggccagcgt	catgtgcagc	660
tacaacaaga	tcaacggctc	gtggggctgc	gagaacgacc	acgccccaaa	cggcctgctc	720
aagaaggagc	tcggcttcaa	gggttacgtc	gtcagcgact	ggaacgcgca	gcacacgacc	780
gacggcgccg	ccaacaacgg	catggacatg	accatgccgg	gcagcgacta	caacggcaac	840
aacgtgctct	ggggccccga	gctcagcaac	gccgtcaaca	gcaaccgggt	ctcgcgcgac	900
cggctcgacg	acatggccaa	acgcatectc	acctcatggt	acctcctggg	ccagaactcg	960
ggctaccca	acatcaacat	caacgccaac	gtgcagggca	accacaagga	gaacgtgcgg	1020
gcggtggcgc	gcgacggcat	cgtgctgctc	aagaacgacg	agggcgtgct	cccgtgaag	1080
aagccaggca	aggtggctct	cgtcggatcg	gcggcctcgg	tcaacagcgc	gggccccaac	1140

ES 2 612 744 T3

gcgtgcgtcg acaagggctg caacacgggc gcgctcggca tgggctgggg gtccgggtcc 1200  
 gtcaactacc cctactttgt ggcgccctac gacgcgctca agacgcgcgc ccagggccgac 1260  
 ggcaccacgc tcagcctgca caactcggac tcgaccaacg gcgtatcggg cgtggtgtcg 1320  
 ggcgccgacg tggccatcgt ggtgatcacg gcggactcgg gcgagggcta catcacggtc 1380  
 gagggccacg ccggcgaccg caaccacctg gacccgtggc acgacggcaa cgcgctggtt 1440  
 aaggcggtag cgcggccaa caagaacacc atcgtggtag tgcacagcac agggcccatc 1500  
 atcctcgaga ccatcctggc gacggagggt gtcaaggcgg ttgtgtgggc cggcctgccg 1560  
 agtcaggaga acggcaacgc gctagttagc gttttgtacg gcctgacttc gccctcaggc 1620  
 aaactggtct actccatcgc caagcgcgcc gaggactatg gcacggcccc ctccaagggc 1680  
 agtaacgaca agttcaccga aggcctgttt gtcgactacc ggcactttga caacgccaag 1740  
 attgagccgc ggtacgagtt tggctttggt ttgtcctaca ccgaattcac ctacgccgac 1800  
 ctctccgtca cttccaccgt aacggccggc cccgcctcag gcgagaccat acccggcggc 1860  
 gcggccgacc tctgggagac tgtcgcaacg gtcacggcgt ccatcacgaa cagcggcgag 1920  
 gtggagggcg ccgaggtggc gcagctgtac atcacgctgc cgtcggcggc cccctcgacg 1980  
 ccgccaagc agctgcgcgg gttcgccaag ctcaagctcg agccgggggc gtcgggcgtc 2040  
 gcgacctca acctgcgccg tcgcatctg agttattggg atgccgggcg cggccagtgg 2100  
 gtggtgccgg cgggcgagtt tacggtttcg gttggtgcga gttcgagggg tgtgcgcttg 2160  
 acggggagct tgactgctta g 2181

<210> 16  
 <211> 726  
 <212> PRT  
 <213> *Chaetomium globosum*  
 <400> 16

5

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

10

ES 2 612 744 T3

Gln Ala Ala Ser Thr Trp Asp Thr Glu Leu Met Arg Gln Arg Gly Glu  
 100 105 110

Tyr Leu Gly Ala Glu Ala Lys Gly Cys Gly Ile His Val Leu Leu Gly  
 115 120 125

Pro Val Ala Gly Ala Leu Gly Lys Ile Pro His Gly Gly Arg Asn Trp  
 130 135 140

Glu Gly Phe Gly Thr Asp Pro Tyr Leu Ala Gly Ile Ala Met Ala Glu  
 145 150 155 160

Thr Ile Glu Gly Leu Gln Ser Ala Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His  
 165 170 175

Tyr Ile Val Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asp  
 180 185 190

Val Asp Asp Arg Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp  
 195 200 205

Ala Val His Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile  
 210 215 220

Asn Gly Ser Trp Gly Cys Glu Asn Asp His Ala Gln Asn Gly Leu Leu  
 225 230 235 240

Lys Lys Glu Leu Gly Phe Lys Gly Tyr Val Val Ser Asp Trp Asn Ala  
 245 250 255

Gln His Thr Thr Asp Gly Ala Ala Asn Asn Gly Met Asp Met Thr Met  
 260 265 270

Pro Gly Ser Asp Tyr Asn Gly Asn Asn Val Leu Trp Gly Pro Gln Leu  
 275 280 285

Ser Asn Ala Val Asn Ser Asn Arg Val Ser Arg Asp Arg Leu Asp Asp  
 290 295 300

Met Ala Lys Arg Ile Leu Thr Ser Trp Tyr Leu Leu Gly Gln Asn Ser  
 305 310 315 320

Gly Tyr Pro Asn Ile Asn Ile Asn Ala Asn Val Gln Gly Asn His Lys  
 325 330 335

Glu Asn Val Arg Ala Val Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn  
 340 345 350

Asp Glu Gly Val Leu Pro Leu Lys Lys Pro Gly Lys Val Ala Leu Val  
 355 360 365



ES 2 612 744 T3

Gly Ser Ala Ala Ser Val Asn Ser Ala Gly Pro Asn Ala Cys Val Asp  
 370 375 380  
 Lys Gly Cys Asn Thr Gly Ala Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Ser  
 385 390 395 400  
 Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Leu Lys Thr Arg  
 405 410 415  
 Ala Gln Ala Asp Gly Thr Thr Leu Ser Leu His Asn Ser Asp Ser Thr  
 420 425 430  
 Asn Gly Val Ser Gly Val Val Ser Gly Ala Asp Val Ala Ile Val Val  
 435 440 445  
 Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly His Ala  
 450 455 460  
 Gly Asp Arg Asn His Leu Asp Pro Trp His Asp Gly Asn Ala Leu Val  
 465 470 475 480  
 Lys Ala Val Ala Ala Ala Asn Lys Asn Thr Ile Val Val Val His Ser  
 485 490 495  
 Thr Gly Pro Ile Ile Leu Glu Thr Ile Leu Ala Thr Glu Gly Val Lys  
 500 505 510  
 Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Asn Gly Asn Ala Leu  
 515 520 525  
 Val Asp Val Leu Tyr Gly Leu Thr Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val Tyr  
 530 535 540  
 Ser Ile Ala Lys Arg Pro Glu Asp Tyr Gly Thr Ala Pro Ser Lys Gly  
 545 550 555 560  
 Ser Asn Asp Lys Phe Thr Glu Gly Leu Phe Val Asp Tyr Arg His Phe  
 565 570 575  
 Asp Asn Ala Lys Ile Glu Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser  
 580 585 590  
 Tyr Thr Glu Phe Thr Tyr Ala Asp Leu Ser Val Thr Ser Thr Val Thr  
 595 600 605  
 Ala Gly Pro Ala Ser Gly Glu Thr Ile Pro Gly Gly Ala Ala Asp Leu  
 610 615 620  
 Trp Glu Thr Val Ala Thr Val Thr Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly Glu  
 625 630 635 640

ES 2 612 744 T3

Val Glu Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Leu Pro Ser Ala  
 645 650 655

Ala Pro Ser Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu Lys  
 660 665 670

Leu Glu Pro Gly Ala Ser Gly Val Ala Thr Phe Asn Leu Arg Arg Arg  
 675 680 685

Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Ala Gly Arg Gly Gln Trp Val Val Pro Ala  
 690 695 700

Gly Glu Phe Thr Val Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Val Arg Leu  
 705 710 715 720

Thr Gly Ser Leu Thr Ala  
 725

<210> 17  
 <211> 2208  
 <212> ADN  
 <213> *Neurospora crassa*

5

<400> 17

atgcaccttc gaatatttgc ggtggttggcc gcgacttccc tcgacctgggc cgagactagc 60  
 gagaacaag ctcgtcaagc tggctcaggt tttgctggcgt gggacgcagc ctattctcag 120  
 gcaagcactg ctctctccaa gctttcacag caagacaagg tcaacatcgt caccggagtc 180  
 ggctggaata agggcccatg tgttggcaac accccagcta ttgcatcaat cggttatccc 240  
 cagctctggt tacaagacgg ccctctcggc attcggtttg gaggaagtgt caccgcgttc 300  
 acgcctggta tccaggcggc ttcaacatgg gacgtcgaac tgattcgaca gcgcggcgtc 360  
 tacctcggty cagaagccag aggggttggc gtacatgtcc ttcttgacc cgtggccgga 420  
 gcgcttgga agatcccaaa tgggtggacgt aactgggagg gctttggtcc ggatccctac 480  
 ctcacaggta ttgcatgag cgaacaatt gaagggatcc agagcaatgg tgtacaagct 540  
 tgcgccaagc acttcattct caacgaacag gagacaaacc gcgatactat cagcagtgtc 600  
 gtcgacgacc gcaccatgca tgaactatac ctcttccctt ttgccgatgc cgtacactca 660  
 aatggtgcaa gtgtgatgtg cagctacaac aaggctcaacg gtacgtgggc atgtgagaat 720  
 gacaaaatcc agaatggcct tctcaagaaa gagctaggct tcaaaggata tgtcatgagt 780  
 gattggaacg cccagcacac cacgaacggc gctgcaaaca gtggtatgga tatgacgatg 840  
 ccaggcagtg actttaatgg caagacgatc ctgtggggac cacagctcaa caccgccgtc 900  
 aacaatggcc aggtctccaa agcaagactg gacgacatgg ccaagcgcac tctcgcacg 960  
 tggatattac tcgagcaaaa ctcaggctac cctgcgacta acctcaaggc caatgttcaa 1020  
 ggaaaccaca aggagaacgt tcgcgacgtg gcaagagacg gcattgttct gctgaagaac 1080  
 gacgataaca tcctcccgt caagaagcct agcaagctgg caatcattgg gtcacgtgcc 1140

10

ES 2 612 744 T3

gttgtcaacc ctgCGGgaag gaacgcctgc accgatcgag gatgcaacac cggTgcgctc 1200  
 ggcAtgggtt ggggctccgg cacggccgat taccctact tcgtagcacc ctatgatget 1260  
 ctcaagacgc gggctcagtc cgacggaaca actgtcaacc tactcagctc tgacagcacc 1320  
 agcggcgtag ccaacgctgc ctccggagcc gacgcggcac tagtcttcat cacagccgat 1380  
 tccggcgaag gctacatcac ggTcgagggc gtgaccggcg accgtcccaa cctcgatccc 1440  
 tggcacaacg gcaaccagct agtccaagcc gtggctcaag ccaacaagaa caccattgtc 1500  
 gtcgtccaca gtaccggccc catcattctg gagactatcc tcgCgcagcc gggcgtcaag 1560  
 gcggctgtgt gggccggtct cccagccaa gagaacggca acgcccTgtt cgatgtccta 1620  
 tacggcttgg tctctccctc gggtaagctg ccgtatacta tcgccaagag cgaaagcgac 1680  
 tacggcactg ccgtgcaaag gggagggagc gatctgttca ctgagggTct gttcatcgat 1740  
 taccgccact ttgacaagaa cggtatcgct ccccggtatg agttcggTtt cggTctttcc 1800  
 tacacgaact tcaectactc ctccctctcc atcaectcca ccgctctctc cggTcccgcc 1860  
 tcgggtgaca ccatccctgg cggccgcgcc gacctctggg aaaccgtggc aaccgtcact 1920  
 gccgtcgtca aaaacacggg tggTgtgcag ggcgcgagg caccCCagct atacatcacc 1980  
 ttgccctctt ccgcgccgtc gagcccgccg aaacagctca gagggTttgc aaagctgaag 2040  
 ctggcgcCCg gggagagcaa gacagctacg ttcatTTtgc ggaggagggg tttgagttat 2100  
 tgggatacgg gcagccagaa ttgggtggTg cctagtggca gctttggggT ggtagtgggt 2160  
 gctagtTcga gggattTgag gttgaatggg aagTttgatg tttattga 2208

<210> 18  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Neurospora crassa

5

<400> 18

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

10

ES 2 612 744 T3

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

ES 2 612 744 T3

Lys Pro Ser Lys Leu Ala Ile Ile Gly Ser Ser Ser Val Val Asn Pro  
 370 375 380  
 Ala Gly Arg Asn Ala Cys Thr Asp Arg Gly Cys Asn Thr Gly Ala Leu  
 385 390 395 400  
 Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asp Tyr Pro Tyr Phe Val Ala  
 405 410 415  
 Pro Tyr Asp Ala Leu Lys Thr Arg Ala Gln Ser Asp Gly Thr Thr Val  
 420 425 430  
 Asn Leu Leu Ser Ser Asp Ser Thr Ser Gly Val Ala Asn Ala Ala Ser  
 435 440 445  
 Gly Ala Asp Ala Ala Leu Val Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly  
 450 455 460  
 Tyr Ile Thr Val Glu Gly Val Thr Gly Asp Arg Pro Asn Leu Asp Pro  
 465 470 475 480  
 Trp His Asn Gly Asn Gln Leu Val Gln Ala Val Ala Gln Ala Asn Lys  
 485 490 495  
 Asn Thr Ile Val Val Val His Ser Thr Gly Pro Ile Ile Leu Glu Thr  
 500 505 510  
 Ile Leu Ala Gln Pro Gly Val Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro  
 515 520 525  
 Ser Gln Glu Asn Gly Asn Ala Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Leu Val  
 530 535 540  
 Ser Pro Ser Gly Lys Leu Pro Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Glu Ser Asp  
 545 550 555 560  
 Tyr Gly Thr Ala Val Gln Arg Gly Gly Thr Asp Leu Phe Thr Glu Gly  
 565 570 575  
 Leu Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys Asn Gly Ile Ala Pro Arg  
 580 585 590  
 Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser Tyr Thr Asn Phe Thr Tyr Ser Ser  
 595 600 605  
 Leu Ser Ile Thr Ser Thr Ala Ser Ser Gly Pro Ala Ser Gly Asp Thr  
 610 615 620  
 Ile Pro Gly Gly Arg Ala Asp Leu Trp Glu Thr Val Ala Thr Val Thr  
 625 630 635 640

ES 2 612 744 T3

Ala Val Val Lys Asn Thr Gly Gly Val Gln Gly Ala Glu Ala Pro Gln  
 645 650 655

Leu Tyr Ile Thr Leu Pro Ser Ser Ala Pro Ser Ser Pro Pro Lys Gln  
 660 665 670

Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu Lys Leu Ala Pro Gly Glu Ser Lys Thr  
 675 680 685

Ala Thr Phe Ile Leu Arg Arg Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Gly  
 690 695 700

Ser Gln Asn Trp Val Val Pro Ser Gly Ser Phe Gly Val Val Val Gly  
 705 710 715 720

Ala Ser Ser Arg Asp Leu Arg Leu Asn Gly Lys Phe Asp Val Tyr  
 725 730 735

## REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado o purificado que tiene una actividad beta-glucosidasa mejorada respecto a la actividad beta-glucosidasa de la proteína BGL1 de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2), **caracterizado por que** comprende una secuencia de aminoácidos en la que al menos un aminoácido está modificado respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, seleccionándose dicho aminoácido modificado entre las posiciones 225, 238, 240 y 241 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, y **caracterizado por que** dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en
- una secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14;
  - una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90 %, preferentemente 95 %, 98 % o 99 %, con la secuencia SEQ ID NO: 2 y que comprende la modificación Q225H;
  - una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90 %, preferentemente 95 %, 98 % o 99 %, con la secuencia SEQ ID NO: 2 y que comprende las modificaciones V238I, T240G y T241S; y
  - una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90 %, preferentemente 95 %, 98 % o 99 %, con la secuencia SEQ ID NO: 2 y que comprende las modificaciones Q225H, V238I, T240G y T241S.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, **caracterizado por que** dicho polipéptido comprende además al menos un aminoácido adicional modificado seleccionado entre las posiciones 97, 99, 100, 118, 119, 121, 123, 126, 127, 128, 130, 132, 134, 135, 140, 147, 151, 153, 163, 168, 173, 174, 177, 179, 182, 187, 193, 206, 207, 212, 217 y 621 de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2.
3. Polipéptido según la reivindicación 1 o 2, **caracterizado por que** dicho polipéptido comprende además al menos un aminoácido modificado adicional, seleccionándose dicha modificación del grupo que consiste en V97I, Y99F, S100G, V118T, N119E, I121M, E123Q, Q126E, F127Y, I128L, E130A, V132A, A134G, S135C, S135V, I140L, P147A, T151I, Q153H, V163T, T168A, G173A, G173S, Q174E, N177E, I179L, V182A, V182N, T187C, L193V, N206D, P207V, L212M, T217L, L621F y L621T.
4. Ácido nucleico purificado o aislado, **caracterizado por que** codifica al menos un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Vector, **caracterizado por que** comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4.
6. Célula hospedadora aislada, **caracterizada por que** comprende o bien al menos uno de los polipéptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o al menos uno de los ácidos nucleicos según la reivindicación 4, o al menos uno de los vectores según la reivindicación 5.
7. Célula hospedadora aislada según la reivindicación 6, **caracterizada por que** se selecciona entre *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Saccharomyces*.
8. Célula hospedadora aislada según la reivindicación 6 o 7, **caracterizada por que** se selecciona entre *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisea*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckii*, *Clostridium butylicum* y sus mezclas.
9. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la hidrólisis de beta-oligosacáridos.
10. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la hidrólisis de celobiosa en glucosa.
11. Uso de un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la producción de biocombustible.
12. Composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica, produciéndose dicha composición enzimática a través de hongos filamentosos y comprendiendo al menos un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
13. Procedimiento de producción de biocombustible a partir de la biomasa, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:
- suspender en una fase acuosa la biomasa a hidrolizar;
  - añadir una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica según la reivindicación 12 para iniciar la hidrólisis;
  - dosificar los azúcares liberados;

- separar la solución de azúcar de la fracción sólida no hidrolizada;
- fermentar la solución de azúcar;
- separar el biocombustible del mosto de fermentación.

5 14. Procedimiento de producción de biocombustible a partir de biomasa, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:

- suspender en una fase acuosa la biomasa a hidrolizar;
  - añadir simultáneamente una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica según la reivindicación 12 y un organismo de fermentación;
  - separar el biocombustible del mosto de la fermentación.
- 10



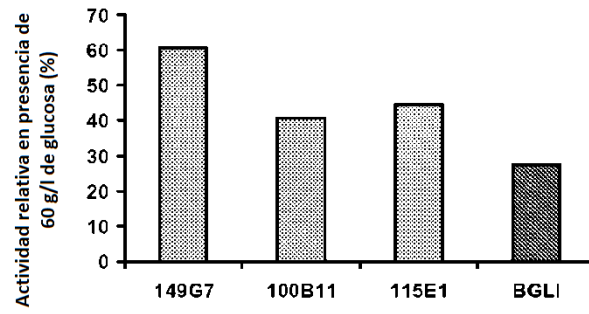


FIGURA 1

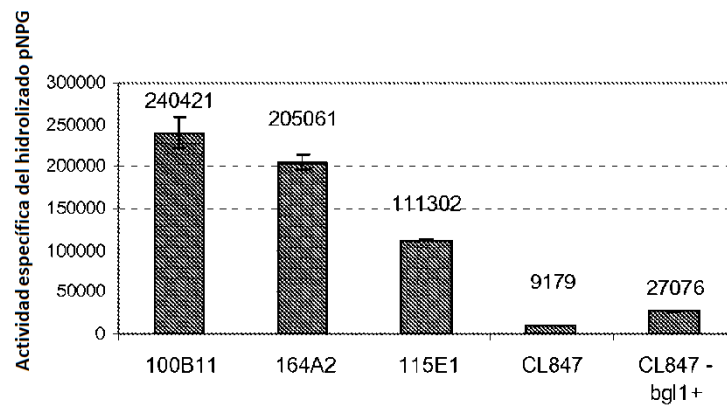


FIGURA 2

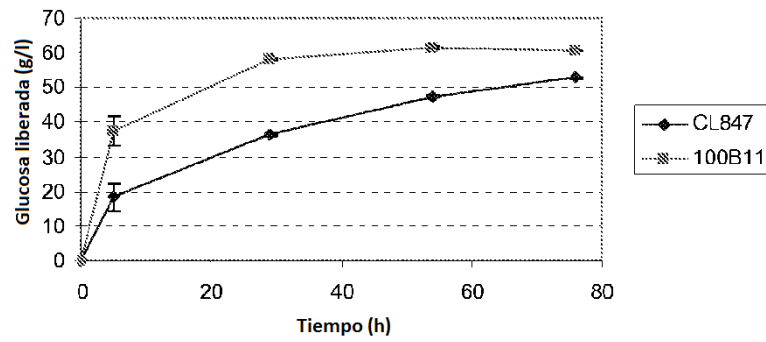


FIGURA 3