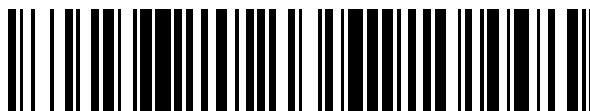


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 631 678**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

C12P 7/10 (2006.01)

C12P 19/02 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12P 7/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2013 PCT/FR2013/052036**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14037667**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2013 E 13774720 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2893010**

54 Título: **Polipéptido con actividad de beta-glucosidasa reforzada a baja temperatura**

30 Prioridad:

05.09.2012 FR 1258260

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

04.09.2017

73 Titular/es:

IFP ÉNERGIES NOUVELLES (33.3%)

1 & 4, avenue de Bois-Préau

92852 Rueil-Malmaison Cedex, FR;

PROTEUS (33.3%) y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE

SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)

72 Inventor/es:

MARGEOT, ANTOINE;

MATHIS, HUGUES;

AYRINHAC, CÉLINE;

ULLMANN, CHRISTOPHE;

PERSILLON, CÉCILE;

FORT, SÉBASTIEN;

ARMAND, SYLVIE y

PETIT, MAUD

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 631 678 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

Polipéptido con actividad de beta-glucosidasa reforzada a baja temperatura

5 **Sector de la técnica**

La posibilidad de producir etanol a partir de celulosa ha llamado la atención ya que se dispone de una gran cantidad de materia prima y también debido al interés del etanol como carburante. Las materias primas naturales celulósicas para un proceso de este tipo reciben el nombre de "biomasa". Para la producción de biocarburante como posibles materias primas se consideraron numerosos tipos de biomasa, por ejemplo, la madera, los residuos agrícolas, los cultivos herbáceos y los desechos sólidos municipales. Estas materias están formadas principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina.

15 **Estado de la técnica**

La celulosa es un polímero formado por moléculas de glucosa unidas por enlaces beta 1-4, que son muy resistentes a la degradación o a la despolimerización. Una vez que la celulosa se convierte en glucosa, ésta se fermenta fácilmente como biocarburante, por ejemplo etanol, usando una levadura.

20 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 diluidos. Sin embargo, varios inconvenientes tales como la mala recuperación del ácido durante el uso de ácidos concentrados y la baja producción de glucosa en el contexto de la utilización de ácidos diluidos perjudican a la economía del proceso de hidrólisis ácida.

25 Para superar los inconvenientes del proceso de hidrólisis ácida, los procesos de conversión de celulosa se han centrado más recientemente en la hidrólisis enzimática, con la ayuda de enzimas de tipo celulasa. Sin embargo, esta hidrólisis enzimática de la biomasa lignocelulósica (por ejemplo, celulosa) presenta el inconveniente de ser un proceso industrial costoso. Por lo tanto, es necesario utilizar cepas de microorganismos secretoras de celulasas cada vez más eficaces. Como tal, muchos microorganismos comprenden enzimas que hidrolizan la celulosa, tales como los hongos *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Humicola*, *Fusarium* así como bacterias tales como *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Cellulomonas* y *Streptomyces*. Las enzimas secretadas por estos microorganismos poseen tres tipos de actividades útiles en la conversión de celulosa en glucosa y se dividen en tres grupos: las endoglucanasas, que atacan las fibras de celulosa de forma aleatoria internamente, las exoglucanasas que atacarán los extremos de las fibras liberando celobiosa, y las beta-glucosidasas que hidrolizan esta celobiosa en glucosa. Estas últimas constituyen la etapa limitante del proceso de conversión de la celulosa. De hecho, la primera dificultad del proceso es la conversión de la celobiosa en glucosa, ya que toda celobiosa no hidrolizada al final del proceso representa una pérdida de rendimiento durante la producción de biocarburante.

40 Esta acumulación de celobiosa es un problema importante en la hidrólisis enzimática, dado que varios microorganismos productores de celulasas, incluyendo *Trichoderma*, producen muy poca beta-glucosidasa. De hecho, menos de un 1 % de las proteínas totales secretadas por cepas industriales de *Trichoderma* son de tipo beta-glucosidasa. Por lo tanto, esta pequeña cantidad de beta-glucosidasa da como resultado una baja capacidad para hidrolizar la celobiosa en glucosa; por tanto, su acumulación en el sistema. O una alta concentración de celobiosa inhibe la actividad de otras celulasas y en particular las exoglucanasas para las que la celobiosa es el producto final de la reacción. Para superar estos inconvenientes, los inventores han desarrollado en su solicitud de patente WO2010/029259 genes de beta-glucosidasa que permiten la obtención de enzimas con un aumento de la actividad específica, lo que mejora de forma significativa el proceso de conversión de biomasa lignocelulósica en biocarburante.

50 La hidrólisis y la fermentación se pueden realizar siguiendo diferentes esquemas. El más común consiste en una hidrólisis y una fermentación separadas (SHF - Hidrólisis y Fermentación Separada). Este método permite optimizar cada etapa para el mantenimiento de las condiciones óptimas de reacción. Esta fermentación se lleva a cabo de manera extemporánea, a una temperatura entre aproximadamente 28 °C y aproximadamente 30 °C, mientras que la hidrólisis se produce generalmente a una temperatura de al menos 45 °C. Sin embargo, en la SHF, los azúcares liberados al final de la reacción tienen una concentración muy elevada de la enzima y conlleva una inhibición de las enzimas, disminuyendo la eficiencia del proceso.

60 Para evitar estos inconvenientes, se puede tener en cuenta otro tipo de proceso (SSF - Sacarificación y Fermentación Simultáneas). En la SSF, las dos etapas (hidrólisis y fermentación de hexosas) se producen de manera simultánea impidiendo la acumulación de azúcares a concentraciones inhibitorias para las enzimas. Los costes de inversión también se reducen como consecuencia de la utilización de un solo reactor. La tasa de hidrólisis es más elevada como consecuencia de la ausencia de inhibición ya que los azúcares liberados se utilizan inmediatamente para la fermentación de etanol.

65 En este método, la temperatura del reactor constituye necesariamente un compromiso entre las temperaturas óptimas de hidrólisis y de fermentación, por lo general entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C. Sin

embargo, a una temperatura de este tipo, la actividad de las enzimas celulolíticas, incluyendo la beta-glucosidasa, disminuye en aproximadamente un 30 %.

5 Por lo tanto existe una necesidad de enzimas capaces de mantener una actividad de beta-glucosidasa eficaz a las temperaturas óptimas de hidrólisis y de fermentación de un proceso de SSF, en particular a una temperatura entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C.

Objeto de la invención

10 Los inventores han desarrollado un polipéptido que tiene una actividad de beta-glucosidasa mejorada a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C, en particular con respecto a la actividad de beta-actividad de la proteína BGL1 de tipo silvestre de la SEQ ID N° 3. BGL1 corresponde a la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*.

15 Los inventores identificaron previamente varios clones con una actividad específica de beta-glucosidasa mejorada con respecto a la actividad de beta-glucosidasa de la proteína BGL1 de tipo silvestre. Los resultados de este tipo se presentan en su solicitud de patente WO 2010/029259. De forma más específica, los inventores desarrollaron un clon en particular que codifica un polipéptido de secuencia SEQ ID N° 5 (denominado 100B11) cuya expresión en *Trichoderma reesei* bajo el control de un promotor fuerte conlleva un factor de aumento de la actividad de beta-glucosidasa de 26,2 (tabla 6 de la solicitud de patente WO 2010/029259) del cóctel enzimático producido con respecto al producido por una cepa que no expresa esta enzima.

20 En la actualidad los inventores han desarrollado, de manera sorprendente e inesperada, un nuevo clon, que codifica una enzima que presenta una actividad mejorada con respecto al clon 100B11 identificado previamente, y este tiene una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C.

25 Por lo tanto, la invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1.

30 La secuencia de aminoácidos del polipéptido de la invención es como sigue a continuación:

MRYRTAAALALATGPFARADSHSTSGASAEAVVPPAGTPWGTAYDKAKAALAK
 LNLQDKVGVSGVWNGGPCVGNTPASKIGYPQLCLQDGPLGIRFGGSVTAFTP
 GIQAASWDTLMRQRGEYLGAEAKGCGIHVLLGPVAGPLGKTPQGGRNWEFG
 GVDPYLTGIAMAETIEGLQSAGVQACAKHYIVNEQELNRETISSNPDDRTLHEL
 YLWPFADAVHANVASVMCSYNKINGSWACEDQYTLQTVLKDQLGFPGYVMTDW
 NAQHHTTVQSANSGLDMSMPGTFDFNGNRLWGPALTNVNSNQVPTSRVDDMV
 TRILAAWYLTGQDQAGYPSFNISRNQGNHKTNVRAIARDGIVLLKNDANILPLK
 KPASIAVVGSAAIIGNHARNSPSCNDKGCDDGALGMGWGSGAVNYPYFVAPYD
 AINTRASSQGTQVTLNNTDNTSSGASAARGKDVAIVFITADSGEGYITVEGNAGD
 RNNLDPWHNGNALVQAVAGANSNVIVVHVSVAIILEQILALPQVKA VVWAGL
 PSQESGNALVDVLWGDVSPSGKLVYTIKSPNDYNTRIVSGGSDSFSEGLFIDYK
 HFDDANITPRYEFGYGLSYTKFNYSRLSVLSTAKSGPATGAVVPGGPSDLFQNV
 A TVTVDIANSQVTGAEVAQLYITYPSSAPRTPPKQLRGFALNLTGQSGTATFNI
 RRRDLSYWD TASQKWVPSGSFGISVGASSRDIRLTSTLSVA.

35 Este polipéptido está codificado por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 2.

40 Preferentemente, dicho polipéptido de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1 tiene una actividad de beta-glucosidasa a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C mejorada, en particular con respecto a la actividad de beta-glucosidasa de la proteína BGL1 de tipo silvestre de secuencia SEQ ID N° 3 a estas mismas temperaturas. La proteína BGL1 está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 4.

Más preferentemente, dicho polipéptido de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1 tiene una actividad de beta-glucosidasa a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C mejorada con respecto a la actividad de beta-glucosidasa del polipéptido 100B11 de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 5 a estas mismas temperaturas. El polipéptido 100B11 está codificado por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 6.

Además, el polipéptido de acuerdo con la invención presenta la ventaja de ser menos sensible a la inhibición por la glucosa y de ese modo conserva una mejor actividad de beta-glucosidasa en presencia de una concentración elevada de glucosa.

En un modo de realización, el polipéptido tal como se ha descrito anteriormente tiene una actividad de beta-glucosidasa determinada en presencia de glucosa que está mejorada con respecto a la actividad de beta-glucosidasa de la proteína BGL1 de tipo silvestre (SEQ ID N° 3) determinada en ausencia de glucosa.

En un modo de realización precedente, el polipéptido de la invención tiene una actividad de beta-glucosidasa mejorada de al menos un 10 %, preferentemente de al menos un 20 %, preferentemente de al menos un 30 %, incluso más preferentemente de al menos un 40 % a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C con respecto a la actividad de beta-glucosidasa del polipéptido 100B11 de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 5.

Por ejemplo, el experto en la materia podrá determinar el aumento o, dicho de otro modo, la mejora de la actividad enzimática de un polipéptido de acuerdo con la invención mediante un ensayo de actividad enzimática con la ayuda del sustrato para-nitrofenil beta-D-glucopiranosido (pNPG). La cantidad de para-nitrofenol obtenida después de la acción de la beta-glucosidasa se podrá determinar por ejemplo mediante la lectura de la densidad óptica a 414 nm.

Un ejemplo de protocolo, que el experto en la materia podrá utilizar para determinar si un polipéptido de acuerdo con la invención presenta una actividad enzimática mejorada con respecto a la de la proteína BGL1 de tipo silvestre, es el que sigue a continuación:

- preparación de un cultivo de reserva de *E. coli* que expresa un polipéptido de acuerdo con la invención durante toda la noche a 37 °C;
- siembra de un medio de cultivo LB con un 1 % de cultivo de reserva durante 24 h a 20 °C;
- centrifugación durante 2 minutos a 13000 rpm;
- resuspensión de los sedimentos celulares con tampón de succinato 100 mM a pH 5 (DO₆₀₀ final = 100);
- incubación de 50 µl de células con 100 µl de tampón de succinato 100 mM a pH 5 que contiene 15 mM de para-nitrofenil beta-D-glucopiranosido (pNPG) durante 1 h 30 a 50 °C, seguido de 5 minutos sobre hielo;
- adición de 150 µl de Na₂CO₃ 0,2 M;
- centrifugación durante 2 minutos a 13000 rpm;
- lectura de la densidad óptica a 414 nm sobre 150 µl de sobrenadante.

Además, el experto en la materia podrá utilizar el protocolo descrito anteriormente incubando los 50 µl de células con 100 µl de tampón de succinato 100 mM a pH 5 que contiene 15 mM de pNPG y 60 g/l de glucosa durante 1 h 30 a 50 °C, para determinar si un polipéptido de acuerdo con la invención es menos sensible a la inhibición por la glucosa que la proteína BGL1 de tipo silvestre.

Estos protocolos se podrán adaptar fácilmente para medir la mejora de la actividad de beta-glucosidasa en condiciones de temperatura comprendidas entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C, en particular con respecto al polipéptido 100B11 de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 5.

La invención también se refiere un ácido nucleico que codifica el polipéptido de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1. Preferentemente, dicho ácido nucleico comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 2.

La invención también se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con la invención, por « vector » se hace referencia a cualquier secuencia de ADN en la que es posible insertar fragmentos de ácido nucleico extraño, vectores que permiten introducir ADN extraño en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores son los plásmidos, los cósmidos, los cromosomas artificiales de levaduras (YAC), los cromosomas artificiales de bacterias (BAC) y los cromosomas artificiales obtenidos a partir del bacteriófago P1 (PAC), los lectores obtenidos a partir de virus.

De acuerdo con la invención, el ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente se podrá unir de forma operativa a un promotor, un terminador o cualquier otra secuencia necesaria para su expresión en la célula hospedadora.

El vector de acuerdo con la invención también podrá hacer referencia a un marcador de selección. Por « marcador

de selección » se hace referencia a un gen cuya expresión confiere, a las células que lo contienen, una característica que permite seleccionarlos. Por ejemplo, se trata de un gen de resistencia a los antibióticos.

5 La invención también tiene como objeto una célula hospedadora aislada capaz de producir el polipéptido de la invención tal como se ha descrito anteriormente, o que comprende un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido de la invención.

10 El experto en la materia podrá introducir al menos el polipéptido, el ácido nucleico o el vector tal como se ha descrito anteriormente en la célula hospedadora con métodos convencionales bien conocidos. Por ejemplo, se puede mencionar el tratamiento con cloruro de calcio, electroporación, la utilización de una pistola de partículas.

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

20 De acuerdo con un modo de realización, la célula hospedadora aislada tal como se ha descrito anteriormente se elige entre *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Saccharomyces*.

25 De acuerdo con un modo de realización preferente, la célula hospedadora aislada tal como se ha descrito anteriormente se elige entre *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningü*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium lucknowense*, *Aspergillus wentü*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisae*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckü*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* y sus mezclas.

30 De acuerdo con un modo de realización preferente, la célula hospedadora aislada tal como se ha descrito anteriormente se elige entre *Trichoderma reesei* y *Saccharomyces cerevisiae*.

La invención también se refiere a la utilización del polipéptido tal como se ha descrito anteriormente o una cualquiera de las células descritas anteriormente para la hidrólisis de los beta-oligosacáridos.

35 La invención también se refiere a la utilización del polipéptido tal como se ha descrito anteriormente o una cualquiera de las células descritas anteriormente para la hidrólisis de celobiosa en glucosa.

La invención también tiene como objeto la utilización del polipéptido tal como se ha descrito anteriormente o una cualquiera de las células descritas anteriormente para la producción de biocarburante.

40 De acuerdo con la invención, el término biocarburante se puede definir como cualquier producto obtenido por la transformación de la biomasa y que se puede utilizar con fines energéticos. Por un lado, y sin desear limitarse, a modo de ejemplo se pueden mencionar biogases, productos que se pueden incorporar (opcionalmente después de una transformación posterior) a un carburante o puede ser un carburante en su totalidad, tal como alcoholes (etanol, butanol y/o isopropanol de acuerdo con el tipo de organismo de fermentación utilizado), disolventes (acetona),
45 ácidos (butírico), lípidos y sus derivados (ácidos grasos de cadenas cortas o largas, ésteres de ácidos grasos), así como hidrógeno.

50 De manera preferente, el biocarburante de acuerdo con la invención es un alcohol, por ejemplo etanol, butanol y/o isopropanol. Más preferentemente, el biocarburante de acuerdo con la invención es etanol.

En otro modo de realización, el biocarburante es biogas.

55 En otro modo de realización, el producto es una molécula interesante en la industria química tal como por ejemplo otros alcoholes tales como 1,2-propano diol, 1,3-propano diol, 1,4-butano diol, 2,3-butano diol, ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, acrílico, butírico, succínico, málico, fumárico, cítrico, itacónico, o hidroxiácidos tales como ácido glicólico, hidroxipropiónico, o láctico.

60 Además de la producción de biocarburante, el polipéptido que tiene una actividad de beta-glucosidasa mejorada a una temperatura comprendida entre 30 °C y 35 °C también se utiliza en otros tipos de aplicaciones catalizando la hidrólisis de diversos sustratos, permitiendo de este modo la liberación de una diversidad de aromas. A modo de ejemplo, se puede utilizar con el fin de liberar aromas de frutas al hidrolizar varios glucósidos presentes en el interior de estas frutas o incluso, puede hidrolizar los monoterfenil beta-glucósidos de uvas que representan por lo tanto una fuente importante de aromas para el vino. En consecuencia, el polipéptido tal como se ha descrito anteriormente se puede utilizar en varios campos, en particular en perfumería, en industria alimentaria, en enología, etc.

65 Las cepas de hongos filamentosos, de preferencia *Trichoderma*, más preferentemente *T. reesei*, capaces de

expresar el polipéptido de acuerdo con la invención se cultivan en fermentadores, en presencia de un sustrato de carbono, tal como lactosa o glucosa, elegido para el crecimiento del microorganismo. En un modo de realización, este sustrato de carbono, de acuerdo con su naturaleza, se introduce en el fermentador antes de su esterilización o se esteriliza por separado y se introduce en el fermentador después de la esterilización de este último para obtener una concentración inicial de 20 a 35 g/l.

A continuación se añade una solución acuosa que contiene un sustrato elegido para la producción de enzimas. Una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica producida por los hongos se recupera por último por filtración del medio de cultivo. En esta composición, en particular se encuentran endoglucanasas, exoglucanasas y la beta-glucosidasa de acuerdo con la invención. En un modo de realización, la solución acuosa que contiene sustrato elegido para la producción de las enzimas se prepara en la concentración de 200-250 g/l; esta solución debe contener un sustrato inductor tal como lactosa. Esta solución acuosa se inyecta después del agotamiento del sustrato de carbono inicial con el fin de aportar una cantidad optimizada, comprendida entre 35 y 45 mg/g de células ("semicontinua"). Durante esta fase "semicontinua", la concentración residual de azúcar en el medio de cultivo es inferior a 1 g/l y las enzimas que actúan sobre la biomasa lignocelulósica son secretadas por el hongo. Estos últimos se pueden recuperar por filtración del medio de cultivo.

La invención tiene como objeto una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica, siendo dicha composición enzimática producida por hongos filamentosos o levaduras y comprende el polipéptido tal como se ha descrito anteriormente.

Por último, la invención tiene como objeto un proceso de producción de biocarburante a partir de biomasa que comprende las siguientes etapas:

- puesta en suspensión en fase acuosa del material a hidrolizar;
- hidrólisis en presencia de una composición enzimática de la biomasa lignocelulósica tal como se ha descrito anteriormente con el fin de producir un hidrolizado que contiene glucosa;
- fermentación de la glucosa del hidrolizado;
- separación del biocarburante del caldo de fermentación,

caracterizado por que las etapas de hidrólisis y de fermentación se realizan de manera simultánea.

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

- puesta en suspensión en fase acuosa de la biomasa a hidrolizar;
- adición simultánea de una composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica tal como se ha definido anteriormente y un organismo de fermentación e incubación;
- separación del biocarburante del caldo de fermentación.

Otro objeto de la invención es un proceso de producción de biocarburante a partir de biomasa, caracterizado por que comprende las siguientes etapas sucesivas:

- puesta en suspensión en fase acuosa de la biomasa a hidrolizar;
- adición de uno o varios organismos celulolíticos y/o de fermentación como se ha definido anteriormente a una temperatura comprendida entre 30 °C y 35 °C con el fin de producir un caldo de fermentación;
- separación del biocarburante del caldo de fermentación.

De acuerdo con este modo de realización, la celulosa presente en la biomasa se convierte en glucosa, y al mismo tiempo, en el mismo reactor, el organismo de fermentación (por ejemplo una levadura) convierte la mucosa en un producto final de acuerdo con un proceso de SSF (Sacarificación y Fermentación Simultánea) conocido por el experto en la materia. De acuerdo con las capacidades metabólicas es hidrolíticas del organismo de fermentación, el buen desarrollo de la operación puede necesitar la adición de una cantidad más o menos importante de mezcla celulolítica exógena.

En otro modo de realización, el organismo de fermentación produce el polipéptido objeto de la invención, mediante secreción o en la superficie de su célula, opcionalmente de forma conjunta con otras enzimas que actúan sobre la biomasa lignocelulósica, limitando o suprimiendo de ese modo la necesidad de enzimas producidas por el hongo filamentosos.

La utilización del polipéptido que presenta una mejor actividad de beta-glucosidasa a una temperatura comprendida entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 35 °C de acuerdo con la presencia invención presenta por lo tanto la ventaja de obtener un mejor rendimiento de producción de glucosa. Por lo tanto, la presente invención permite utilizar menos enzima que anteriormente, lo que presenta una ventaja económica, siendo el coste de la producción del biocarburante, por ejemplo, menor.

Otros aspectos, objetos, ventajas y características de la invención, estarán presentes con la lectura de la descripción no limitante que sigue a continuación y que describe modos de realización precedentes de la invención proporcionados por medio de ejemplos.

5 Descripción detallada de la invención

Ejemplos

EJEMPLO 1: 1ª ronda de combinación

La secuencia del gen de *Trichoderma reesei* de la beta-glucosidasa (gen precursor BGL1, SEQ ID N° 4) se sometió a una primera ronda de combinación de acuerdo con el proceso patentado que se describe en el documento EP 1104457B1 con el supuesto gen de la glucosidasa de *Chaetomium globosum* (gen A) (SEQ ID NO: 7, codificado por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 8) que posee un 70 % de identidad con el gen precursor BGL1.

1 - Cribado a caudal elevado

Un ensayo de cribado a caudal elevado permitió seleccionar los mejores clones obtenidos de la combinación de estas dos secuencias, es decir, los que presentan un factor de mejora superior a 2 al nivel de la actividad de beta-glucosidasa cuando se comparan con el gen precursor BGL1 de *T. reesei*.

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

- aislamiento sobre gelosa de las diferentes colonias de *E.coli* que expresan las variantes de combinación de la enzima recombinante de acuerdo con la invención y puesta en cultivos previos en medio LB de dichas colonias durante la noche a 37 °C;
- inoculación de un medio LB a un 3 % con el cultivo previo después de incubación durante 4 h a 37 °C;
- inducción de la expresión de las variantes por adición de isopropil-beta-tio-galactósido (IPTG) 100 µM y a continuación incubación a 20 °C durante la noche;
- centrifugación durante 2 minutos a 13000 rpm;
- resuspensión de los sedimentos celulares en 100 µl de tampón de succinato 0,1 M que contiene 2,2 mM de para-nitrofenil beta-D-glucopiranosido (pNPG);
- incubación durante 3 h a temperatura ambiente;
- lectura de la densidad óptica a 414 nm después de alcalinización.

En estas condiciones de cribado, se identificaron varios clones que presentan una mejora de la actividad de beta-glucosidasa con respecto a la enzima de referencia BGLI.

2 - Determinación de la mejora de la actividad de beta-glucosidasa

2-1/ Sobre el sustrato pNPG

Con el fin de determinar la kcat relativa de las variantes seleccionadas en la primera ronda de combinación, se procede la siguiente forma:

- formación de un cultivo de reserva de *E. coli* que expresa una enzima recombinante de acuerdo con la invención durante toda la noche a 37 °C;
- siembra de un medio de cultivo LB con un 1 % de cultivo de reserva durante 24 h a 20 °C con inducción con IPTG (250 µM);
- centrifugación durante 2 minutos a 13000 rpm;
- resuspensión de los sedimentos celulares con tampón de succinato 100 mM a pH 5 (DO₆₀₀ final = 100); incubación de 50 µl de células con 100 µl de tampón de succinato 100 mM a pH 5 que contiene 15 mM de para-nitrofenil beta-D-glucopiranosido (pNPG) durante 1 h 30 a 50 °C seguido de 5 minutos sobre hielo;
- adición de 150 µl de Na₂CO₃ 0,2 M;
- centrifugación durante 2 minutos a 13000 rpm;
- lectura de la densidad óptica a 414 nm sobre 150 µl de sobrenadante.

La tabla 2 presenta los valores de las kcat así como los factores de mejoras obtenidos para tres clones identificados anteriormente (denominados 10H7, 59B8 y 164A2) en estas condiciones experimentales.

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

	Clones	K _{cat} (min ⁻¹)	Factor de mejora
Clones de la 1ª ronda	10H7	590,0	8

	59 B8	518,6	7
	164A2	1437,3	20
Proteína de referencia	BGLI	71,0	1

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

5 **2-2/ Sobre celobiosa**

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

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

- sembrar un medio de cultivo LB con un 1 % de cultivo de reserva inducido con IPTG después de incubación durante toda la noche a 37 °C.
- 15 - cultivar dichas células a 37 °C hasta la obtención de una densidad óptica a 600 nm de 0,4.
- inducir dichas células con IPTG 250 µM a 20 °C durante 20 horas.
- lavar los sedimentos celulares tres veces en un tampón de succinato 100 mM a pH 5 para eliminar la glucosa del medio de cultivo.
- 20 - preparar una mezcla de reacción (MR1) formada por 10 µl de dichas células y 190 µl de celobiosa a 263,2 mM (250 mM final) durante 12 horas a 50 °C en microplaca
- incubar durante 12 horas a 50 °C en microplaca.

Revelación:

- 25 - Preparar una mezcla de reacción (MR2) formada por:
 - 10 µl de MR1
 - 90 µl de tampón de succinato 100 mM a pH 5
 - 5 µl de glucosa oxidasa a 44 U/ml
- 30 - Incubar durante 1 h a temperatura ambiente
- Mezclar e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente
- 35 - 10 µl de MR2
- 2 µl de peroxidasa de rábano picante a 10 u/ml
- 5 µl de ABTS 100 mM
- 83 µl de tampón de fosfato a pH 7,4
- 40 - Leer las densidades ópticas a 420 nm.

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

	Clones	K _{cat} (min ⁻¹)	Factor de mejora
Clones de la 1ª ronda	10H7	69,1	13
	59 B8	37,7	7
	164A2	213,2	41
Proteína de referencia	BGLI	5,2	1

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

50 **EJEMPLO 2: 2ª ronda de combinación**

Las secuencias de los genes mejorados obtenidos en la primera ronda de combinación a continuación se sometieron a una segunda ronda de combinación (siempre de acuerdo con el proceso patentado que se describe en el

documento EP1104457B1). Con el fin de aumentar la diversidad genética, se añadió al menos un gen que codificaba una beta-glucosidasa con un 70 % de identidad con la enzima BGL1 de tipo silvestre.

De forma más precisa, se utilizó el supuesto gen de la glucosidasa de *Neurospora crassa* (gen C) (SEQ ID N° 9 codificadas por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 10).

1 - Cribado a caudal elevado

Un ensayo de cribado a caudal elevado tal como se ha descrito anteriormente (con excepción de la etapa de inducción con IPTG, ya que la mejora proporcionada en la primera ronda de combinación permite una detección de la actividad de beta-glucosidasa basada únicamente en la filtración del promotor) se realizó sobre los clones obtenidos como resultado de esta segunda ronda de combinación, con el fin de seleccionar los mejores clones, es decir, los que presentan un factor de mejora superior a 2 al nivel de la actividad de beta-glucosidasa cuando se comparan con el clon 164A2.

En estas condiciones de cribado, se encontró una mejora de la actividad de beta-glucosidasa con respecto a la enzima de referencia (164A2) en varios clones, de los cuales en particular los clones 100B11 (SEQ ID NO: 5 codificada por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 6), 115E1 (SEQ ID NO: 11 codificada por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 12).

2 - Determinación de la mejora de la actividad de beta-glucosidasa

2-1/ Sobre pNPG

Con el fin de determinar la kcat relativa, las actividades de los clones 100B11 y 115E1 se midieron con el ensayo de actividad tal como se ha descrito anteriormente.

La tabla 4 presenta los valores de las kcat así como los factores de mejoras obtenidos para los clones 100B11 y 115E1 en estas condiciones experimentales.

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

	Clones	K _{cat} (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 de las actividades enzimáticas muy importantes con respecto a la enzima de referencia (164A2) y a (BGLI) (X60) para los clones 100B11 y 115E1.

2-2/ Sobre celobiosa

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

Con el fin de determinar la kcat relativa, las actividades de los clones 100B11 y 115E1 se midieron con el ensayo de actividad a 50 °C tal como se ha descrito anteriormente utilizando celobiosa como sustrato como se ha descrito anteriormente en el punto 2-2 del ejemplo 1.

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

	Clones	K _{cat} (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 de las actividades enzimáticas muy importantes con respecto a la enzima de referencia (164A2) para los clones 100B11 y 115E1 cuando la celobiosa se utiliza como sustrato.

EJEMPLO 3: 3ª ronda de combinación

Las secuencias de 14 genes mejorados (138E12, 134G2, 100B11, 115E1, 99G11, 127B12, 91F6, 135F9, 116D9, 212D11, 210A6, 124F5, 129D2 y 141F7) obtenidos en la segunda ronda de combinación a continuación se sometieron a una tercera ronda de combinación (siempre de acuerdo con el proceso patentado que se describe en el documento EP1104457B1). Con el fin de aumentar la diversidad genética, se añadió al menos un gen que codificaba una beta-glucosidasa con un 70 % de identidad con estos genes. En concreto en este ejemplo, se utilizaron el supuesto gen de la beta-glucosidasa de *Neurospora crassa* (gen C) (SEQ ID N° 9 codificado por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 10) y el supuesto gen de la beta-glucosidasa de *Chaetomium globosum* (gen A) (SEQ ID N° 7 codificado por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 8).

1 - Cribado a caudal elevado

Un ensayo de cribado a caudal elevado tal como se ha descrito anteriormente (con excepción de la etapa de inducción con IPTG, ya que la mejora proporcionada en la primera ronda de combinación permite una detección de la actividad de beta-glucosidasa basada únicamente en la filtración del promotor) se realizó sobre los clones obtenidos como resultado de esta tercera ronda de combinación. La actividad de estos clones se midió a 30 °C y a 50 °C.

En estas condiciones de cribado, se seleccionó el clon 17E5 (de secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1, codificada por la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 2) ya que presenta una proporción de actividad interesante a 30 °C/50 °C.

La tabla 6 presenta las actividades relativas obtenidas a 50 °C y a 30 °C para el clon 17E5 y para el clon 100B11 (clon de referencia obtenido a partir de la segunda ronda de combinación).

TABLA 6: Actividades relativas a 30 °C

	50 °C	30 °C
17E5	100 %	80 %
100B11	100 %	53 %

Los resultados muestran que el clon 17E5 conserva un 80 % de actividad a 30 °C con respecto a su actividad a 50 °C frente a un 53 % para el clon 100B11.

Además, su actividad específica es superior a un factor 2 con respecto a la de la enzima 100B11.

2 - Determinación de la actividad de beta-glucosidasa

Con el fin de determinar la kcat relativa, la actividad del clon 17E5 se midió a 30 °C y a 50 °C mediante el ensayo de actividad tal como se ha descrito anteriormente.

La tabla 7 presenta el valor de la kcat así como el factor de mejora obtenidos para el clon 17E5 en estas condiciones experimentales.

TABLA 7: Mejora de la actividad de beta-glucosidasa a 30 °C (resultados de los cultivos no inducidos)

	kcat (min ⁻¹)		mejora	
	30 °C	50 °C	30 °C	50 °C
17E5	4,2	10,94	2,32	2,17
100B11	1,81	5,03		

Los resultados muestran una mejora de la actividad enzimática del clon 17E5 de un factor 2 con respecto al plan de referencia y esto a las dos temperaturas.

EJEMPLO 4: Expresión de las variantes mejoradas de las beta-glucosidasas en *Trichoderma reesei*

El gen 17E5, se clonó en un vector que permitía la expresión en una cepa de *Trichoderma reesei* obtenida a partir de RUT C30 (ATCC 56765), CL847 (Durand *et al*, Enzyme Microb. Technol., 1988; 10: 341-346) con selección mediante higromicina (gen Hph de *Streptomyces hygrosopicus*). El gen 17E5 se colocó bajo el control de un promotor fuerte *cbhl*, inducible al mismo tiempo que las otras celulasas de *T. reesei*.

La transformación de *Trichoderma reesei* se realizó de acuerdo con los métodos clásicos conocidos por el experto en la materia (transformación de protoplastos mediante choque cálcico y selección con 50 µg/ml de higromicina). Los transformantes se purificaron mediante esporulación y a continuación se trasplantaron dos veces en medio selectivo para la eliminación de los clones inestables.

A continuación se evaluaron treinta clones en la producción de celulasas en placas de 24 pocillos. Algunas esporas de cada clon se utilizaron para sembrar 2 ml de un medio que tenía la siguiente composición: lactosa 20 g/l, celulosa Solka flocc 20 g/l, Peptona 5 g/l, KH₂PO₄ 15 g/l, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, CaCl₂ 0,6 g/l, MgSO₄ 0,6 g, FeSO₄ 0,00 MnSO₄ 0,0014 g/l, ZnSO₄ 0,0014 g/l, CoCl₂ 0,0037 g/l, 11,6 g/l de ácido maleico, 12,1 g/l de Tris y 2,08 g/l de NaOH. Los viales se pusieron a incubar a 30 °C con agitación a 150 rpm.

Al cabo de 5 días, los cultivos se centrifugaron y la concentración de proteínas del sobrenadante se midió mediante el método de Folin. La actividad de beta-glucosidasa de los sobrenadantes se midió por hidrólisis del sustrato cromóforo para-nitrofenil beta-D-glucopiranosido (pNPG) en las siguientes condiciones:

- 50 mM de tampón citrato a pH 4,8
- 5 mM de pNPG
- 10 µl de muestra de ensayo
- incubación a 30 °C durante 30 min.

La reacción se interrumpió mediante la adición de 100 µl de carbonato de sodio a un 2 %. Se midió la cantidad de para-nitrofenol liberado por la hidrólisis del pNPG mediante la medición de la absorbancia a 410 nm y se comparó con un intervalo de para-nitrofenol. La reacción era lineal de 25 a 400 µM de para-nitrofenol. Las muestras de ensayo se diluyeron opcionalmente a que la absorbancia medida permaneciera en la linealidad del intervalo. La actividad de beta-glucosidasa también se midió a 50 °C, en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente para su comparación. Se seleccionaron los clones que presentan la actividad de beta-glucosidasa más importante (superior a menos de un factor 5 con respecto a la cepa de origen).

La tabla 8 muestra las actividades de beta-glucosidasa pNPasa a 35 °C/50 °C medidas en 1 µmol/min/mg de encima para sobrenadantes obtenidos respectivamente a partir de una cepa CL847 de tipo silvestre, de una cepa que expresa la variante 100B11 y de uno de los clones que expresan la variante 17E5 obtenidos de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Tabla 8: Actividades de beta-glucosidasa de CL847 de tipo silvestre, del polipéptido 100B11 y del polipéptido 17E5

	Proporción de actividad a 30 °C/50 °C	Actividad específica a 30 °C	Actividad específica a 50 °C
CL847	0,2	0,06	0,3
100B11	0,3	3,7	12,5
17E5	0,5	4,7	9,5

Se observa un aumento de la proporción 30 °C/50 °C en el clon 17E5, con una actividad específica superior a la de la variante 100B11 a la temperatura de 30 °C.

EJEMPLO 5: Expresión recombinante de la beta-glucosidasa de tipo silvestre (BGL1) y de las variantes mejoradas 100B11 y 17E5 en *Saccharomyces cerevisiae*

1- Producción de las proteínas BGL1, 100B11 y 17E5 en el citoplasma de las levaduras:

El gen de la beta-glucosidasa de tipo silvestre de *Trichoderma reesei* (BGL1) así como estas dos variantes 100B11 y 17E5 se clonaron sin péptido señal en el vector pESC-Leu (Agilent Technologies). Esta construcción permite la expresión de la proteína en el citoplasma de la cepa EBY100 de *Saccharomyces cerevisiae*, auxótrofa para leucina y triptófano (Boder ET y Wittrup KD, Biotechnol Prog, 1998, 14: 55-62). Este plásmido permite colocar la expresión de los genes bajo el control del promotor GAL1 inducible con galactosa, y posee el gen marcador de selección de auxotrofia (Leu2) que permite la selección de los transformantes. La proteína producida también se fusiona con la etiqueta c-myc en la posición N-terminal, lo que permite la detección y la unificación de la enzima producida mediante cromatografía por afinidad.

La transformación de EBY100 de *S. cerevisiae* se realizó de acuerdo con los métodos clásicos conocidos por el experto en la materia (transformación de levaduras mediante choque térmico y acetato de litio). Los transformantes se seleccionaron sobre medio YNB-Glc-Trp que contenía un 0,67 % de Base de Nitrógeno para Levadura (YNB), un 2 % de glucosa y un 0,01 % de triptófano.

Un transformante para cada gen (Sc-BGL1, Sc-100B11 y Sc-17E5) se utilizó para sembrar 15 ml de un medio mínimo de YNB-Glc-CAA-Trp que contenía un 0,67 % de YNB, un 0,5 % de casaminoácido (CAA), un 0,01 % de triptófano y 2 % de glucosa. Después de 24 horas de cultivo previo a 30 °C con agitación a 220 rpm, las 3 cepas, Sc-BGL1, Sc-100B11 y Sc-17E5, se utilizaron para sembrar (a una DO₆₀₀ de 0,5) 150 ml de medio de YNB-Gal-CAA-Trp que contenía un 0,67 % de YNB, un 0,5 % de CAA, un 0,01 % de triptófano y un 2 % de galactosa. Los cultivos se incubaron a 25 °C con agitación a 220 rpm.

Después de 4 días de incubación, 20 ml de cultivo se centrifugaron a 3 000 g, a 4 °C durante 5 min. Los sedimentos de las levaduras se volvieron a poner en 3 ml de tampón de citrato 50 mM a pH 5 y se lisaron por vía mecánica con una presión de 250 MPa. El extracto citoplasmático se obtuvo después de centrifugación durante 30 min a 50 000 g a 4 °C.

2- Determinación de la actividad de beta-glucosidasa

La concentración de las proteínas totales en el extracto citoplasmático se calculó como media mediante dosificación de Bradford (Bradford MM., Anal Biochem, 1976, 72:248-54) a 1,7 mg/ml.

La actividad de beta-glucosidasa de los extractos citoplasmáticos se midió mediante hidrólisis del sustrato para-nitrofenil beta-D-glucopiranosido (pNPG) en un volumen de 600 µl en las siguientes condiciones:

- 50 mM de tampón citrato a pH 5
- 5 mM de pNPG
- 3,6 µl de extracto citoplasmático que contenía 6,1 µg de proteínas de totales
- Incubación a 30 °C o 50 °C durante 30 min.

La reacción se detuvo añadiendo 100 µl de carbonato de sodio a 1 M a 100 µl de reacción de hidrólisis de. La concentración de para-nitrofenol (pNP) liberado por hidrólisis del pNPG se determinó por medición de la absorbancia a 415 nm y se comparó con un intervalo patrón del para-nitrofenol (lineal de 0,36 µM a 360 µM). Los extractos citoplasmáticos se diluyeron opcionalmente para estar en condición de velocidad inicial de reacción.

La tabla 9 muestra las proporciones de actividad de beta-glucosidasa a 30 °C/50 °C medidas en µmol.min⁻¹.mg⁻¹ de proteínas totales para extractos citoplasmáticos obtenidos respectivamente a partir de una cepa que expresa la enzima de tipo silvestre (Sc-BGL1), de una cepa que expresa 100B11 (Sc-100B11) y de una cepa que expresa 17E5 (Sc-17E5).

Tabla 9: Actividades de beta-glucosidasa de Sc-BGL1, Sc-100B11 y Sc-17E5

	Actividad específica a 30 °C	Actividad específica a 50 °C	Proporción de actividad a 30 °C/50 °C	Mejora de la actividad específica a 30 °C con respecto a BGL1 de tipo silvestre
Sc-BGL1	0,15	0,41	0,4	-
Sc-100B11	0,18	0,64	0,3	1,2
Sc-17E5	0,46	1,12	0,4	3,1

Los resultados muestran que la actividad específica a 30 °C de la cepa Sc-17E5 es superior a un factor 3 con respecto a la cepa Sc-BGL1 y a un factor 2,5 con respecto a Sc-100B11.

EJEMPLO 6: Purificación y caracterización de la beta-glucosidasa de tipo silvestre (BGL1) y de las variantes mejoradas 100B11 y 17E5 producidos en *S. cerevisiae*

1- Purificación de las beta-glucosidasas

Los extractos citoplasmáticos de Sc-BGL1 y de las variantes Sc-100B11 y Sc-17E5 del ejemplo 5 se utilizan para purificar las enzimas correspondientes, BGL1, 100B11 y 17E5 de acuerdo con el siguiente protocolo:

se incubaron 500 µl de extracto citoplasmático con 20 µl de resina "Anti-c-Myc tag Gel" (MBL) durante 1 h a 4 °C con agitación axial. Después de 10 segundos de centrifugación a 13 000 rpm, la resina se lavó 3 veces con tampón PBS 1X. Después de la incubación de la resina durante 5 min a 4 °C en una solución de elución formada por el péptido c-myc (EQKLISEEDL) a 1 mg.ml⁻¹, la elución de la proteína se realizó centrifugando 10 segundos a 13 000 rpm.

2- Determinación de la actividad de beta-glucosidasa

La concentración de las enzimas purificadas se obtiene por medición de la absorbancia a 280 nm con nanodrop,

usando un coeficiente de extinción molar igual a $120\ 125\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para BGL1 nativo y $120\ 250\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ para 100B11 y 17E5. Como media es igual a 0,19 mg/ml.

5 La pureza de cada enzima se verificó electroforesis sobre gel de poliacrilamida a un 10 % en presencia de SDS mediante coloración de las proteínas con Azul de Coomassie.

La actividad de BGL1 y de las variantes 100B11 y 17E5 purificadas se midió a 30 °C y a 50 °C como se ha descrito anteriormente.

10 La tabla 10 muestra las actividades específicas de cada enzima (en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de enzima) determinadas durante la hidrólisis del pNPG a 30 °C y 50 °C.

Tabla 10: Actividades de beta-glucosidasa de BGL1, 100B11 y 17E5 purificados

	Actividad específica a 30 °C	Actividad específica a 50 °C	Proporción de actividad a 30 °C/50 °C	Mejora de la actividad específica a 30 °C con respecto a BGL1 de tipo silvestre
BGL1	5,1	8,9	0,57	-
100B11	7,1	17,2	0,41	1,4
17E5	10,2	23,6	0,43	2,0

15 Los resultados muestran una mejora a 30 °C de la actividad específica de la variante 17E5 de un factor 2 con respecto a BGL1 de tipo silvestre y de 1,4 con respecto a la variante 100B11.

LISTADO DE SECUENCIAS

20 <110> IFP Energies nouvelles

<120> Polipéptido con actividad de beta-glucosidasa reforzada a baja temperatura

<130> BFF120334

25

<160> 12

<170> BiSSAP 1.0

30

<210> 1

<211> 744

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei*

35

<400> 1

ES 2 631 678 T3

Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr Gly Pro Phe
 1 Ala Arg Ala Asp 5 Ser His Ser Thr Ser 10 Gly Ala Ser Ala Glu Ala Val
 Val Pro Pro Ala Gly Thr Pro Trp Gly Thr Ala Tyr Asp Lys Ala Lys
 35 Ala Ala Leu Ala Lys Leu Asn Leu Gln Asp Lys Val Gly Ile Val Ser
 50 Gly Val Gly Trp Asn Gly 55 Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Ser Pro Ala
 65 Ser Lys Ile Gly Tyr 70 Gly Pro Gln Leu Cys Leu Gln Asp Gly Pro Leu Gly
 Ile Arg Phe Gly 85 Gly Ser Val Thr Ala Phe Thr Pro Gly Ile Gln Ala
 100 Ala Ser Thr Trp Asp Thr Glu Leu Met Arg Gln Arg Gly Glu Tyr Leu
 115 Gly Ala Glu Ala Lys Gly Cys Gly Ile His Val Leu Leu Gly Pro Val
 130 Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly
 145 Phe Gly Val Asp Pro 150 Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Ala Glu Thr Ile
 165 Glu Gly Leu Gln Ser Ala Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile
 180 Val Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asn Pro Asp
 195 Asp Arg Thr Leu His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val
 210 His Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile Asn Gly
 225 Ser Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp
 245 Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His
 260 Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly
 275 Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn
 290 Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val
 305 Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly
 320 Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr
 340 Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp
 355 Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly
 370 Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn

ES 2 631 678 T3

385 Asp Lys Gly Cys Asp 390 Asp Gly Ala Leu Gly Met 395 Gly Trp Gly Ser Gly
 405 Pro Tyr Phe Val Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr
 420 Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn
 435 Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val
 450 Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn
 465 Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu
 485 Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn Ser Asn Val Ile Val Val Val His
 500 Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val
 515 Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala
 530 Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val
 545 Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser
 565 Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His
 580 Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu
 595 Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala
 610 Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp
 625 Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly
 645 Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser
 660 Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu
 675 Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
 690 Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
 705 Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
 725 Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
 740

- <210> 2
- <211> 2235
- <212> ADN
- <213> *Trichoderma reesei*
- <400> 2

5

ES 2 631 678 T3

atgcgttacc	gaacagcagc	tgcgctggca	cttgccactg	ggccctttgc	tagggcagac	60
agtcactcaa	catcgggggc	ctcggctgag	gcagttgtac	ctcctgcagg	gactccatgg	120
ggaaccgctg	acgacaaggc	gaaggccgca	ttggcaaagc	tcaatctcca	agataaggtc	180
ggcatcgtga	gcggtgtcgg	ctggaacggc	ggtccttgcg	ttggaaacac	atctccggcc	240
tccaagatcg	gctatccaca	gctatgcctt	caagacggac	ccctcggtat	ccgattcggc	300
ggcagcgtca	cagcctttac	gccgggcatc	caagcggcct	cgacgtggga	taccgagttg	360
atgcgccagc	gtggagagta	cctgggtgcc	gaggccaagg	gctgcgggat	tcatgtcctg	420
cttggtcctg	tggctgggcc	gctgggaaag	actccgcagg	gcggtcgcaa	ctgggagggc	480

ES 2 631 678 T3

ttcggtgtcg atccatatct cacgggcatt gccatggccg agacaatcga gggcctgcag 540
 tcggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatcgtca acgagcagga gctcaatcga 600
 gaaaccattt cgagcaacc agatgaccga actctccatg agctgtatct gtggccattt 660
 gccgacgcg ttcacgcca tgctgcttct gtcatgtgct cgtacaacaa gatcaatggc 720
 agctgggctt gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctgggggttc 780
 ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcgaattct 840
 gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctggggcca 900
 gctctacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg 960
 actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc 1020
 aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccaggac 1080
 ggcacgttc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140
 gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcgc ctcgtgcaac 1200
 gacaaagget gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtcaactat 1260
 ccgtacttcg tcgccccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag 1320
 gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcac ctgcagcaag aggaaaggac 1380
 gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac 1440
 gcgggcatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg 1500
 gccggtgcca acagcaacgt cattgttgtt gtccactccg ttggcgccat cattctggag 1560
 cagattcttg ctcttccgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620
 agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg 1680
 tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcga tcgtttccgg cggcagtgac 1740
 agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa tatcacgccg 1800
 cggtagcagt tcggctatgg actgtcttac accaagttca actactcac cctctccgtc 1860
 ttgtcgaccg ccaagtctgg tctgcgact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat 1920
 ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccgtt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980
 gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccatcttcag caccaggac ccctccgaag 2040
 cagctgcgag gctttgcaa gctgaacctc acgcctggtc agagcggaa agcaacgttc 2100
 aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg 2160
 tcggggtcgt ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220
 ctgtcggtag cgtag 2235

<210> 3
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*

5

<400> 3

ES 2 631 678 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
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
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

ES 2 631 678 T3

530 535' 540'
 Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val
 545 Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser
 560
 Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His
 575
 Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu
 580 585 590
 Ser Tyr Thr Lys Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala
 600 605
 Lys Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp
 610 615 620
 625 Leu Phe Gln Asn Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly
 630 635 640
 Gln Val Thr Gly Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser
 645 650 655
 Ser Ala Pro Arg Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu
 660 665 670
 Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
 675 680 685
 Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
 690 695 700 705
 Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
 710 715 720
 Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
 725 730 735
 740

<210> 4
 <211> 2235
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

5

<400> 4

ES 2 631 678 T3

atgCGttacc	gaacagcagc	tgcgctggca	cttgccactg	ggccctttgc	tagggcagac	60
agtcactcaa	catcgggggc	ctcggctgag	gcagttgtac	ctcctgcagg	gactccatgg	120
ggaaccgCGt	acgacaaggc	gaaggccgca	ttggcaaagc	tcaatctcca	agataaggtc	180
ggcatcgtga	gCGgtgtcgg	ctggaacggc	ggtccttgcy	ttggaaacac	atctccggcc	240
tccaagatca	gctatccatc	gctatgcctt	caagacggac	ccctcgggtg	tcgatactcg	300
acaggcagca	cagcctttac	gccgggCGtt	caagcggcct	cgacgtggga	tgtcaatttg	360
atccgCGaac	gtggacagtt	catcgggtgag	gaggtgaagg	cctcggggat	tcatgtcata	420
cttggctcctg	tggctgggCC	gctgggaaag	actccgcagc	gCGgtcGcaa	ctgggagggc	480
ttcgggtgctg	atccatatct	cacgggcatt	gccatgggtc	aaaccatcaa	cggcatccag	540
tcggtagggc	tgcaggcgac	agcgaagcac	tatactctca	acgagcagga	gctcaatcga	600
gaaaccattt	cgagcaaccC	agatgaccga	actctccatg	agctgtatac	ttggccattt	660
gccgacgCGg	ttcaggccaa	tgtcGcttct	gtcatgtgct	cgtacaacaa	ggTcaatacc	720
acctgggCct	gCGaggatca	gtacacgctg	cagactgtgc	tgaaagacca	gctggggttc	780
ccaggctatg	tcatgacgga	ctggaacgca	cagcacacga	ctgtccaaag	cgcgaattct	840
gggcttgaca	tgtcaatgcc	tggcacagac	ttcaacggta	acaatcggct	ctggggcca	900
gctctcacca	atgCGgtaaa	tagcaatcag	gtccccacga	gcagagtcga	cgatatggtg	960
actcgtatcc	tcgCCgcatg	gtacttgaca	ggccaggacc	aggcaggcta	tccgtcgttc	1020

ES 2 631 678 T3

aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccagggac 1080
 ggcacggttc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt 1140
 gccgtcgttg gatctgcccgc aatcattggt aaccacgccca gaaactcggc ctcgtgcaac 1200
 gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atgggttggg gttccggcgc cgtaactat 1260
 ccgtacttcg tcgccccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcaccag 1320
 gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcac ctgcagcaag aggaaaggac 1380
 gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac 1440
 gcgggcatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg 1500
 gccggtgcc aacagcaact cattgttggg gtcactccg ttggcgccat cattctggag 1560
 cagattcttg ctcttccgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620
 agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg 1680
 tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgc tctttccgg cggcagtgac 1740
 agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgccaa taccacgccg 1800
 cggtacgagt tcggctatgg actgtcttac accaagtcca actactcacg cctctccgtc 1860
 ttgtcgaccg ccaagtctgg tctgcgact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat 1920
 ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccggt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980
 gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccatcttcag caccagggac ccctccgaag 2040
 cagctcgcag gctttgcca gctgaacctc acgcctggtc agagcggaac agcaacgttc 2100
 aacatccgac gacgagatct cagctactgg gacacggctt cgcagaaatg ggtggtgccg 2160
 tcggggctct ttggcatcag cgtgggagcg agcagccggg atatcaggct gacgagcact 2220
 ctgtcggtag cgtag 2235

<210> 5
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 5

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

5

10

ES 2 631 678 T3

130 135' 140'
 Ala Gly Pro Leu Gly Lys Thr Pro Gln Gly Gly Arg Asn Trp Glu Gly
 145 Phe Gly Val Asp Pro Tyr Leu Thr Gly Ile Ala Met Ala Glu Thr Ile
 150 155 160
 Glu Gly Leu Gln Ser Ala Gly Val Gln Ala Cys Ala Lys His Tyr Ile
 165 170 175
 Val Asn Glu Gln Glu Leu Asn Arg Glu Thr Ile Ser Ser Asp Val Asp
 180 185 190
 Asp Arg Thr Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val
 195 200 205
 Gln Ala Asn Val Ala Ser Val Met Cys Ser Tyr Asn Lys Ile Asn Gly
 210 215 220 225
 Ser Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp
 230 235 240 245
 Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His
 250 255 260 265
 Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser Gly Leu Asp Met Ser Pro Gly
 270 275 280 285
 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 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 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

ES 2 631 678 T3

```

        675                680                685
Asn Leu Thr Pro Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg
   690
Arg Asp Leu Ser Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro
705
Ser Gly Ser Phe Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg
   710   715
   725   730
Leu Thr Ser Thr Leu Ser Val Ala
   740

```

- <210> 6
- <211> 2235
- 5 <212> ADN
- <213> *Trichoderma reesei*
- <400> 6

ES 2 631 678 T3

atgCGttacc	gaacagcagc	tgcgctggca	cttgccactg	ggccctttgc	tagggcagac	60
agtcactcaa	catcgggggc	ctcggctgag	gcagttgtac	ctcctgcagg	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	taccgagttg	360
atgCGccagc	gtggagagta	cctgggtgcc	gaggccaagg	gctgcgggat	tcatgtcctg	420
cttggctcctg	tggtcgggcc	gctgggaaag	actccgcagg	gCGgtcGcaa	ctgggagggc	480
ttcgggtgtcg	atccatatct	cacgggcatt	gccatggccg	agacaatcga	gggcctgcag	540
tcggccggcg	tgcaggcgtg	cgCGaagcac	tatatcgtca	acgagcagga	gctcaatcga	600
gaaaccattt	cgagcgacgt	cgatgaccga	actatgcatg	agctgtatct	gtggccattt	660
gccgacgcgg	ttcaggccaa	tgtcgttct	gtcatgtgct	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	atgCGgtaaa	tagcaatcag	gtccccacga	gcagagtcga	cgatattggtg	960
actcgtatcc	tcgCCgatg	gtacttgaca	ggccaggacc	aggcaggcta	tccgtcgttc	1020
aacatcagca	gaaatgttca	aggaaaccac	aagaccaatg	tcagggcaat	tgccaggggac	1080
ggcatcgttc	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	tcaggcgcac	ctgcagcaag	aggaaaggac	1380
gtcGCCatcg	tcttcatcac	cgccgactcg	ggtgaaggct	acatcacctg	ggagggcaac	1440
gcgggcgatc	gcaacaacct	ggatccgtgg	cacaacggca	atgccctggt	ccaggcggtg	1500
gccggtgcc	acagcaacgt	cattgttgtt	gtccactccg	ttggcgcac	cattctggag	1560

ES 2 631 678 T3

cagattcttg ctcttccgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag 1620
 agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg 1680
 tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac 1740
 agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcaa taticagccg 1800
 cggtagcagt tcggctatgg actgtcttac accaagttca actactcacg cctctccgtc 1860
 ttttcgaccg ccaagtctgg tctgcgact ggggccgttg tgccgggagg cccgagtgat 1920
 ctgttccaga atgtcgcgac agtcaccggt gacatcgcaa actctggcca agtgactggt 1980
 gccgaggtag cccagctgta catcacctac ccattctcag caccagggac cctccgaag 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

<210> 7
 <211> 726
 <212> PRT
 <213> *Chaetomium globosum*

5

<400> 7

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
 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

10

ES 2 631 678 T3

Ser Asn Ala Val Asn Ser Asn Arg Val Ser Arg Asp Arg Leu Asp Asp
 275 280 285
 290 295 300
 Met Ala Lys Arg Ile Leu Thr Ser Trp Tyr Leu Leu Gly Gln Asn Ser
 305 310 315
 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
 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
 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> 8

<211> 2181

5 <212> ADN

<213> *Chaetomium globosum*

<400> 8

ES 2 631 678 T3

atgacgacgc tccgcaactt tgcgctgctc gcagcggcgg tgcttgccgc ggtcgaggcc 60
ctcgaggccg ccgactgggc tgcggctgag gcctcagcca aaaccgcact ggcaaagatg 120

ES 2 631 678 T3

tcacaacaag acaaaatcag cattgtgacg ggcacgcgct gggacaaggg tccctgtgtc 180
 ggcaacacgg ccgccatcaa ctgatcaac taccgcgacg tctgcctaca ggacggcccc 240
 ctcgggatcc gcttcggcac cggctcgacg gccttcaccc cgggcgtcca agccgcctcg 300
 acatgggata ccgagctgat gcgccagcgc ggcgagtacc tcggggccga ggccaagggg 360
 tgccgcatcc acgtgttgct gggccccgtg gccggggcac tgggcaagat cccgcacggc 420
 gggcgcaact gggaaggatt cgggacggac ccgtacctgg cgggcatcgc catggccgag 480
 acgatcgagg ggctgcagtc ggcgggggtg caggcgtgcg ccaagcacta catcgtcaac 540
 gagcaggagc tcaaccgcga gaccatcagc agcgcgctcg 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 ctgcgcgac 900
 cggctcgacg acatggccaa acgcacctc acctcatggt acctcctggg ccagaactcg 960
 ggctaccca acatcaacat caacgccaac gtgcagggca accacaagga gaacgtgagg 1020
 gcggtggcgc gcgacggcat cgtgctgctc aagaacgacg agggcgtgct cccgctgaag 1080
 aagccaggca aggtggctct cgtcggatcg gcggcctcgg tcaacagcgc gggccccaac 1140
 gcgtgcgctg acaagggctg caacacgggc gcgctcggca tgggctgggg gtccgggtcc 1200
 gtcaactacc cctactttgt ggcgccctac gacgcgctca agacgcgcgc ccaggccgac 1260
 ggcaccacgc tcagcctgca caactcggac tcgaccaacg gcgtatcggg cgtggtgctg 1320
 ggcgccgacg tggccatcgt ggtgatcacg gcggactcgg gcgagggcta catcacggtc 1380
 gagggccacg ccggcgaccg caaccacctg gacccgtggc acgacggcaa cgcgctgggt 1440
 aaggcgggtg ccgcgcccaa caagaacacc atcgtggtag tgcacagcac agggcccatc 1500
 atcctcgaga ccatcctggc gacggagggt gtcaaggcgg ttgtgtgggc cggcctgccg 1560
 agtcaggaga acggcaacgc gctagttagc gttttgtacg gcctgacttc gccctcaggc 1620
 aaactggctc actccatcgc caagcgcgcc gaggactatg gcacggcccc ctccaagggc 1680
 agtaacgaca agttcaccga aggcctgttt gtcgactacc ggcactttga caacgccaa 1740
 attgagccgc ggtacgagtt tggctttggt ttgtcctaca ccgaattcac ctacgccgac 1800
 ctctccgtca ctccaccgt aacggccggc cccgcctcag gcgagaccat acccggcggc 1860
 gcggccgacc tctgggagac tgtcgaacg gtcacggcgt ccatcacgaa cagcggcgag 1920
 gtggagggcg ccgaggtggc gcagctgtac atcacgctgc cgtcggcggc cccctcgacg 1980
 ccgcccagc agctgcgcgg gttcgccaag ctcaagctcg agccgggggc gtcgggcgtc 2040
 gcgaccttca acctgcgccg tcgcgatctg agttattggg atgccggggc cggccagtgg 2100
 gtggtgccgg cgggcgagtt tacggtttcg gttggtgcga gttcgagggg tgtgcgcttg 2160
 acggggagct tgactgctta g 2181

ES 2 631 678 T3

<210> 9
 <211> 735
 <212> PRT
 <213> *Neurospora crassa*

5

<400> 9

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
 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 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
 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

ES 2 631 678 T3

450 455 460
 Tyr Ile Thr Val Glu Gly Val Thr Gly Asp Arg Pro Asn Leu Asp Pro
 465 Trp His Asn Gly Asn Gln Leu Val Gln Ala Val Ala Gln Ala Asn Lys
 470 475 480
 485 490 495
 Asn Thr Ile 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
 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

- <210> 10
- <211> 2208
- <212> ADN
- <213> *Neurospora crassa*
- <400> 10

5

ES 2 631 678 T3

atgcaccttc gaatatttgc ggtgttggcc gcgacttccc tcgcctgggc cgagactagc	60
gagaaacaag ctcgtcaagc tggctcaggt tttgcgcgct 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
tacctcggtg cagaagccag aggggttggc gtacatgtcc ttcttggacc cgtggccgga	420
gcgcttggca agatcccaaa tgggtggacgt aactgggagg gctttggtcc ggatccctac	480
ctcacaggta ttgcatgag cgaaacaatt gaagggatcc agagcaatgg tgtacaagct	540
tgcgccaagc acttcattct caacgaacag gagacaaacc gcgatactat cagcagtgtc	600
gtcgacgacc gcacatgca tgaactatac ctcttcctt ttgccgatgc cgtacactca	660
aatgttgcaa gtgtgatgtg cagctacaac aaggtaacg gtacgtgggc atgtgagaat	720
gacaaaatcc agaatggcct tctcaagaaa gagctaggct tcaaaggata tgatcatgag	780

ES 2 631 678 T3

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 tcgcgcagtg gcaagagacg gcattgttct gctgaagaac 1080
 gacgataaca tcctcccgtc caagaagcct agcaagctgg caatcattgg gtcacatgctc 1140
 gttgtcaacc ctgcggggaag gaacgcctgc accgatcgag gatgcaacac cgggtgcgctc 1200
 ggcattgggtt ggggctccgg cacggccgat taccctact tcgtagcacc ctatgatget 1260
 ctcaagacgc gggctcagtc cgacggaaca actgtcaacc tactcagctc tgacagcacc 1320
 agcggcgtag ccaacgctgc ctccggagcc gacgcggcac tagtcttcat cacagccgat 1380
 tccggcgaag gctacatcac ggtcagggc gtgaccggcg accgtcccaa cctcgatccc 1440
 tggcacaacg gcaaccagct agtccaagcc gtggctcaag ccaacaagaa caccattgtc 1500
 gtcgtccaca gtaccggccc catcattctg gagactatcc tcgcgagacc gggcgtcaag 1560
 gcggtcgtgt gggccggtct ccccagccaa gagaacggca acgcccttgt cgatgtccta 1620
 tacggcttgg tctctccctc gggtaagctg ccgtatacta tcgccaagag cgaaagcgac 1680
 tacggcactg ccgtgcaaag gggagggacg gatctgttca ctgagggctt gttcatcgat 1740
 taccgccact ttgacaagaa cggatcgtc ccccggtatg agttcggttt cggctcttcc 1800
 tacacgaact tcacctactc ctccctctcc atcacctcca ccgcctcctc cggctccgcc 1860
 tcgggtgaca ccatccctgg cggccgcgcc gacctctggg aaaccgtggc aaccgtcact 1920
 gccgtcgtca aaaacacggg tgggtgtcag ggcgccgagg caccacagct atacatcacc 1980
 ttgccctctt ccgcgccgtc gagccccgcc aaacagctca gagggtttgc aaagctgaag 2040
 ctggcgcccc gggagagcaa gacagctacg ttcattttgc ggaggagggg tttgagttat 2100
 tgggatacgg gcagccagaa ttgggtggtg cctagtggca gctttggggg ggtagtgggt 2160
 gctagttcga gggatttgag gttgaatggg aagtttgatg tttattga 2208

<210> 11
 <211> 744
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*

<400> 11

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

5

10

Ile	Arg	Phe	Gly	85	Thr	Gly	Ser	Thr	Ala	Phe	Thr	Pro	Gly	Val	95	Gln	Ala
Ala	Ser	Thr	Trp	100	Asp	Val	Asn	Leu	Ile	Arg	Glu	Arg	Gly	Gln	110	Phe	Ile
Gly	Glu	Glu	Val	115	Lys	Ala	Ser	Gly	Ile	His	Val	Ile	Leu	Gly	Pro	Val	
Ala	Gly	Pro	Leu	130	Gly	Lys	Ile	Pro	His	Gly	Gly	Arg	Asn	Trp	Glu	Gly	
Phe	Gly	Val	Asp	145	Pro	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Ala	Met	Ala	Glu	Thr	Ile	
Glu	Gly	Leu	Gln	165	Ser	Ala	Gly	Val	Gln	Ala	Cys	Ala	Lys	His	Tyr	Ile	
Leu	Asn	Glu	Gln	180	Glu	Leu	Asn	Arg	Glu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Pro	Asp	
Asp	Arg	Thr	Leu	195	His	Glu	Leu	Tyr	Thr	Trp	Pro	Phe	Ala	Asp	Ala	Val	
His	Ala	Asn	Val	210	Ala	Ser	Val	Met	Cys	Ser	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gly	
Ser	Trp	Ala	Cys	225	Glu	Asp	Gln	Tyr	Thr	Leu	Gln	Thr	Val	Leu	Lys	Asp	
Gln	Leu	Gly	Phe	245	Pro	Gly	Tyr	Val	Met	Thr	Asp	Trp	Asn	Ala	Gln	His	
Thr	Thr	Val	Gln	260	Ser	Ala	Asn	Ser	Gly	Leu	Asp	Met	Ser	Met	Pro	Gly	
Thr	Asp	Phe	Asn	275	Gly	Asn	Asn	Arg	Leu	Trp	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Asn	
Ala	Val	Asn	Ser	290	Asn	Gln	Val	Pro	Thr	Ser	Arg	Val	Asp	Asp	Met	Val	
Thr	Arg	Ile	Leu	305	Ala	Ala	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gln	Asp	Gln	Ala	Gly	
Tyr	Pro	Ser	Phe	325	Asn	Ile	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	Gly	Asn	His	Lys	Thr	
Asn	Val	Arg	Ala	340	Ile	Ala	Arg	Asp	Gly	Ile	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Asp	
Ala	Asn	Ile	Leu	355	Pro	Leu	Lys	Lys	Pro	Ala	Ser	Ile	Ala	Val	Val	Gly	
Ser	Ala	Ala	Ile	370	Ile	Gly	Asn	His	Ala	Arg	Asn	Ser	Pro	Ser	Cys	Asn	
Asp	Lys	Gly	Cys	385	Asp	Asp	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Gly	Trp	Gly	Ser	Gly	
Ala	Val	Asn	Tyr	405	Pro	Tyr	Phe	Val	Ala	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ile	Asn	Thr	
Arg	Ala	Ser	Ser	420	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Thr	Asp	Asn	
Thr	Ser	Ser	Gly	435	Ala	Ser	Ala	Ala	Arg	Gly	Lys	Asp	Val	Ala	Ile	Val	
Phe	Ile	Thr	Ala	450	Asp	Ser	Gly	Glu	Gly	Tyr	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Asn	
Ala	Gly	Asp	Arg	465	Asn	Asn	Leu	Asp	Pro	Trp	His	Asn	Gly	Asn	Ala	Leu	
Val	Gln	Ala	Val	485	Ala	Gly	Ala	Asn	Ser	Asn	Val	Ile	Val	Val	Val	His	
Ser	Val	Gly	Ala	500	Ile	Ile	Leu	Glu	Gln	Ile	Leu	Ala	Leu	Pro	Gln	Val	
Lys	Ala	Val	Val	515	Trp	Ala	Gly	Leu	Pro	Ser	Gln	Glu	Ser	Gly	Asn	Ala	
Leu	Val	Asp	Val	530	Leu	Trp	Gly	Asp	Val	Ser	Pro	Ser	Gly	Lys	Leu	Val	
Tyr	Thr	Ile	Ala	545	Lys	Ser	Pro	Asn	Asp	Tyr	Asn	Thr	Arg	Ile	Val	Ser	
Gly	Gly	Ser	Asp	565	Ser	Phe	Ser	Glu	Gly	Leu	Phe	Ile	Asp	Tyr	Lys	His	
Phe	Asp	Asp	Ala	580	Asn	Ile	Thr	Pro	Arg	Tyr	Glu	Phe	Gly	Tyr	Gly	Leu	
Ser	Tyr	Thr	Lys	595	Phe	Asn	Tyr	Ser	Arg	Leu	Ser	Val	Leu	Ser	Thr	Ala	
Lys	Ser	Gly	Pro	610	Ala	Thr	Gly	Ala	Val	Val	Pro	Gly	Gly	Pro	Ser	Asp	

ES 2 631 678 T3

```

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> 12
 <211> 2235
 <212> ADN
 <213> *Trichoderma reesei*

5

<400> 12

```

atgcgttacc gaacagcagc tgcgctggca cttgccactg ggccctttgc tagggcagac      60
agtcactcaa catcgggggc ctcggctgag gcagttgtac ctctgcagg gactccatgg      120
ggaaccgcgt acgacaaggc gaaggccgca ttggcaaagc tcaatctcca agataaggtc      180
ggcatcgtga gcggtgtcgg ctggaacggc ggtccttgcg ttggaaacac atctccggcc      240
tccaagatca gctatccatc gctatgcctt caagacggac ccctcgggat ccgattcggc      300
acaggcagca cagcctttac gccgggcggt caagcggcct cgacgtggga tgtcaatttg      360
atccgcgaac gtggacagtt catcggtgag gaggtgaagg cctcggggat tcatgtcata      420
cttggctctg tggctggggc gctgggaaag atcccgcacg gcggtcgcaa ctgggagggc      480
ttcgggtgctg atccatatct cacgggcatt gccatggccg agacaatcga gggcctgcag      540
tcggccggcg tgcaggcgtg cgcgaagcac tatatcctca acgagcagga gctcaatcga      600
gaaaccattt cgagcaacc cagatgaccga actctccatg agctgtatac ttggccattt      660
gccgacgcgg ttcacgcca tagtcgcttct gtcattgtgct cgtacaacaa gatcaatggc      720
agctgggcct gcgaggatca gtacacgctg cagactgtgc tgaaagacca gctggggttc      780
ccaggctatg tcatgacgga ctggaacgca cagcacacga ctgtccaaag cgcaattct      840
gggcttgaca tgtcaatgcc tggcacagac ttcaacggta acaatcggct ctggggttcca      900
gctctacca atgcggtaaa tagcaatcag gtccccacga gcagagtcga cgatatggtg      960
actcgtatcc tcgccgatg gtacttgaca ggccaggacc aggcaggcta tccgtcgttc      1020
aacatcagca gaaatgttca aggaaaccac aagaccaatg tcagggcaat tgccaggggac      1080
ggcatcgttc tgctcaagaa tgacgccaac atcctgccgc tcaagaagcc cgctagcatt      1140
gccgtcgttg gatctgccgc aatcattggt aaccacgcca gaaactcggc ctcgtgcaac      1200
gacaaaggct gcgacgacgg ggccttgggc atggggtggg gttccggcgc cgtcaactat      1260
ccgtacttcg tcgcgcccta cgatgccatc aataccagag cgtcttcgca gggcacccag      1320
gttaccttga gcaacaccga caacacgtcc tcaggcgcgt ctgcagcaag aggaaaggac      1380

```

10

ES 2 631 678 T3

gtcgccatcg tcttcatcac cgccgactcg ggtgaaggct acatcacctg ggagggcaac	1440
gcgggcgatc gcaacaacct ggatccgtgg cacaacggca atgccctggt ccaggcggtg	1500
gccggtgcca acagcaacgt cattgttggt gtccactccg ttggcgccat cattctggag	1560
cagattcttg ctcttccgca ggtcaaggcc gttgtctggg cgggtcttcc ttctcaggag	1620
agcggcaatg cgctcgtcga cgtgctgtgg ggagatgtca gcccttctgg caagctggtg	1680
tacaccattg cgaagagccc caatgactat aacactcgca tcgtttccgg cggcagtgac	1740
agcttcagcg agggactggt catcgactat aagcacttcg acgacgcca tatcacgccg	1800
cggtagcagt tcggctatgg actgtcttac accaagtcca actactcacg cctctccgtc	1860
ttgtcgaccg ccaagtctgg tctgctgact ggggccgttg 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

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa, que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1.
- 5 2. Ácido nucleico purificado o aislado, **caracterizado por que** codifica el polipéptido de acuerdo con la reivindicación **1**.
3. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación **2**, **caracterizado por que** comprende la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID N° 2.
- 10 4. Vector **caracterizado por que** comprende un ácido nucleico de acuerdo con las reivindicaciones **2 o 3**.
5. Célula hospedadora aislada **caracterizada por que** comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación **1**, o el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación **2** o el vector de acuerdo con la reivindicación **4**.
- 15 6. Célula hospedadora aislada de acuerdo con la reivindicación **5**, **caracterizada por que** se elige entre *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Thermomonospora*, *Myceliophthora*, *Chrysosporium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Yarrowia*, *Pichia* y *Saccharomyces*.
- 20 7. Célula hospedadora aislada de acuerdo con la reivindicación **5 o 6**, **caracterizada por que** se elige entre *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningü*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola griseae*, *Myceliophthora thermopila*, *Chrysosporium lucknowense*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium saccharolyticum*, *Clostridium benjerinckü*, *Clostridium butylicum*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* y sus mezclas.
- 25 8. Célula hospedadora aislada de acuerdo con la reivindicación **6**, **caracterizada por que** es de la especie *Trichoderma reesei*.
- 30 9. Célula hospedadora aislada de acuerdo con la reivindicación **6**, **caracterizada por que** es de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.
- 35 10. Utilización de dicho polipéptido de acuerdo con la reivindicación **1** o de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **5 a 9**, para la hidrólisis de beta-oligosacáridos.
11. Utilización de dicho polipéptido de acuerdo con la reivindicación **1** o de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **5 a 9**, para la hidrólisis de celobiosa en glucosa.
- 40 12. Utilización de dicho polipéptido de acuerdo con la reivindicación **1** o de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **5 a 9** para la producción de biocarburante.
- 45 13. Composición enzimática que actúa sobre la biomasa lignocelulósica, produciéndose dicha composición enzimática por hongos filamentosos y comprendiendo al menos un polipéptido de acuerdo con la reivindicación **1**.
- 50 14. Método de producción de biocarburante a partir de biomasa, que comprende las siguientes etapas:
 - puesta en suspensión en fase acuosa del material a hidrolizar;
 - hidrólisis, en presencia de una composición enzimática de acuerdo con la reivindicación 13 o de una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones **5 a 9**, de la biomasa lignocelulósica, con el fin de producir un hidrolizado que contiene glucosa;
 - fermentación de la glucosa del hidrolizado con el fin de producir un caldo de fermentación;
 - separación del biocarburante del caldo de fermentación,
- 55 realizándose las etapas de hidrólisis y de fermentación de manera simultánea.