

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 603**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2017 PCT/EP2017/051577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.08.2017 WO17129637**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2017 E 17702333 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3408384**

54 Título: **Celobiosa deshidrogenasa mutada con especificidad de sustrato modificada**

30 Prioridad:

26.01.2016 EP 16152770

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

02.07.2020

73 Titular/es:

**DIRECTSENS GMBH (100.0%)
Am Rosenbühel 38
3400 Klosterneuburg, AT**

72 Inventor/es:

**SYGMUND, CHRISTOPH;
LUDWIG, ROLAND y
STOICA, LEONARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 770 603 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

Celobiosa deshidrogenasa mutada con especificidad de sustrato modificada

5 El campo de la presente invención se refiere a la modificación enzimática recombinante para modificar la especificidad de sustrato.

10 La celobiosa deshidrogenasa (EC 1.1.99.18, CDH) fue descubierta por primera vez en 1974 en el sistema enzimático extracelular de *Phanerochaete chrysosporium* y posteriormente en varios otros hongos basidiomicetos. Una característica especial de esta enzima es su composición: la combinación de un dominio de flavodehidrogenasa catalíticamente activo (también llamado “dominio de flavina”), que aloja un FAD unido de forma no covalente, y un dominio de hemo, con un hemo *b* como cofactor. Ambos dominios están conectados por un enlazador. Por su actividad catalítica, la celobiosa de sustrato natural se oxida en una reacción que reduce el FAD del dominio de flavina.

15 La CDH o su dominio de flavodehidrogenasa oxida los carbohidratos como sus sustratos naturales, celobiosa y celo-oligosacáridos, y otros como lactosa y maltosa. Se ha descubierto y demostrado previamente que las CDH son capaces de convertir glucosa de manera eficiente (Harreither et al., 2011; WO 2010/097462 A). Existen CDH modificadas que tienen actividad reducida en maltosa (WO2013/131942). Se conocen otras CDHS de *Metarhizium anisopliae* (Base de datos Uniprot, N.º de Acc. E9DZA5) o *Stemphylium lycopersici* (Base de datos Uniprot, N.º de Acc. A0A0L1HDV7). Gao et al. (Plos Genetics, 7(1), (2001): e1001264) describe la secuenciación genómica de los hongos *Metarhizium anisopliae* y *M. acridum*. El documento de patente EP 2 636 733 A1 describe CDH mutadas artificialmente para reducir su actividad de oxidación de maltosa.

20 El problema con las CDH reside en la versatilidad que disminuye su uso en sensores para detectar un solo analito en mezclas de varios sustratos potenciales. La presente invención se refiere a una celobiosa deshidrogenasa (CDH) modificada como se describe en las presentes reivindicaciones.

30 Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar una celobiosa deshidrogenasa o su dominio de flavodehidrogenasa catalíticamente activo, que sea capaz de detectar selectivamente la lactosa en presencia de glucosa y galactosa, especialmente con electrodos basados en transferencia directa de electrones o electrodos basados en transferencia mediada de electrones para proporcionar sensores adecuados analíticamente útiles.

35 La presente divulgación se refiere a celobiosa deshidrogenasas (CDH) recombinantes modificadas con un recambio reducido de glucosa y galactosa. El objetivo es reducir el efecto de cualquier concentración de glucosa y galactosa presente en una matriz de muestra en la detección de lactosa. En particular, la divulgación proporciona una celobiosa deshidrogenasa (CDH) modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa que tiene una sustitución en el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 (CDH de *M. thermophilum*) o correspondiente a N722 de la SEQ ID NO: 4 (CDH de *N. crassa*) por glutamina, isoleucina, treonina o leucina o una sustitución de la asparagina en el motivo del centro activo que tiene la secuencia de aminoácidos NHW por glutamina, isoleucina, treonina o leucina; por lo tanto, este motivo sería QHW, IHW, THW o LHW. Por lo general, el motivo se encuentra cerca del extremo C terminal de una CDH o del dominio de la flavodehidrogenasa, por ejemplo, alrededor de los aminoácidos 660 a 780 de una CDH o los aminoácidos 430 a 550 de un dominio de flavodehidrogenasa. Las enzimas de celobiosa deshidrogenasa modificadas preferidas de la invención están optimizadas para su uso en biosensores basados en transferencia directa de electrones (3ª generación) o en transferencia mediada de electrones (2ª generación).

50 Para aumentar el rendimiento de CDH como catalizador de electrodo selectivo para lactosa, la modificación genética persiguió la reducción de la actividad de oxidación de glucosa y galactosa sola o en combinación con un aumento de la actividad de oxidación de lactosa. Con la descripción general de la modificación de un dominio de flavodehidrogenasa de CDH, un dominio de alta homología en todas las CDH, es posible modificar cualquier CDH de acuerdo con los principios descritos en la presente memoria para disminuir la sensibilidad a la glucosa y la galactosa. Por lo tanto, la presente invención proporciona en particular una celobiosa deshidrogenasa (CDH) modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa que tiene una actividad reducida de oxidación de glucosa y galactosa en comparación con la CDH no modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa mientras que esencialmente mantiene una alta actividad de oxidación de lactosa, por ejemplo, como máximo una reducción del 20% en la actividad de oxidación de lactosa, en condiciones estándar y como se muestra en los ejemplos. La invención proporciona además un procedimiento de oxidación de la lactosa con la CDH de la invención. Tal procedimiento se usa preferentemente en la detección analítica de lactosa en una muestra. También es posible la detección de maltosa.

60 La mayoría de las CDH son capaces de oxidar la lactosa. La reacción de oxidación se puede detectar, por ejemplo, monitorizando los aceptores de electrones para la reacción redox, tales quinonas, como DCIP (2,6-dicloroindofenol) o- o p-benzoquinona o derivados de las mismas, azul de metileno, verde de metileno, azul de Meldola, ferricianuro de potasio, hexafluorofosfato de ferricenio, FeCl₃ o citocromo c (siendo este último un cofactor

del dominio hemo) o simplemente determinando la corriente eléctrica o las tensiones en un electrodo, siendo el aceptor de electrones la superficie del electrodo.

5 No es necesario usar una CDH completa; el dominio de flavina, incluso sin el dominio hemo, es suficiente para la actividad catalítica. Por lo tanto, el dominio se denomina "dominio funcional" ya que tiene la función de oxidar la lactosa con un aceptor de electrones adecuado. La actividad es ejercida por la enzima celobiosa deshidrogenasa completa o por el dominio de la flavodehidrogenasa catalíticamente activa.

10 Las CDH de tipo salvaje tienen una actividad indeseable para oxidar la glucosa y la galactosa, especialmente en el caso de las CDH de la ascomicota. La modificación de acuerdo con la presente invención debe entenderse ahora en que las CDH de la invención se desvían de las CDH de tipo salvaje por esta actividad de oxidación de glucosa y galactosa sustancialmente disminuida. Esta actividad de oxidación de glucosa y galactosa sustancialmente disminuida puede estar en combinación con una disminución aumentada o solo pequeña en la actividad de oxidación de lactosa. En algunas realizaciones, la invención aumenta la relación de la actividad de oxidación de lactosa a la actividad de oxidación de glucosa y/o galactosa.

15 Las CDH modificadas preferidas o su dominio funcional de flavodehidrogenasa son de una CDH del subreino *dikarya*. Preferentemente, la CDH es de Ascomicota o Basidiomicota. Las ascomicotas preferidas se seleccionan de *Myriococcum thermophilum*, *Corynascus thermophilus*, *Chaetomium atrobrunneum* (*Myceliophthora fergusii*), *Hypoxylon haematostroma*, *Neurospora crassa* o *Stachybotrys bisbyi*. Las basidiomicotas preferidas son *Athelia rolfsii*, *Gelatorporia subvermisporea*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*. Tales CDH no modificadas se describen en los documentos de patente WO 2010/097462 A y WO2013/131942, que incluye secuencias de nucleótidos codificantes, y en secuencias de la SEQ ID NO: 1-10 en la presente memoria descriptiva. Las secuencias adecuadas también están disponibles en las bases de datos de secuencias, en particular la base de datos NCBI, por ejemplo, números de acceso ADT70773.1, ADT70775.1, ADT70772.1, XP_956591.1, ABS45567.2, ADT70777.1, AAO64483.1, ACF60617.1, AAB61455.1, XP_008041466.1. "No modificado" como se usa en la presente memoria es una CDH sin la modificación inventiva que disminuye la actividad de oxidación de glucosa y galactosa. Puede haber modificaciones adicionales que aumenten la interacción entre la flavina y el dominio hemo si se usa una CDH completa (tal como se describe en el documento de patente WO 2010/097462).

20 Preferentemente, la CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa se basa en un dominio de CDH o flavodehidrogenasa no modificada con un motivo central activo que tiene la secuencia $X_1X_2NHWX_3X_4X_5$, en la que X_1 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de N, C y R; X_2 se selecciona de S y A; X_3 se selecciona de V, M e I; X_4 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de G y S; y X_5 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de S, A y T; especialmente preferido X_4 y X_5 no son ambos S. En la enzima o dominio modificado de la invención, el N en este motivo se cambia a Q, I, T o L como se indicó anteriormente. Este cambio facilita el cambio de actividad de la invención reduciendo la actividad en glucosa y/o galactosa. Con la información del motivo, se puede determinar la posición para la sustitución. Preferentemente, también la CDH modificada o el dominio comprende la secuencia $X_1X_2ZHWX_3X_4X_5$, siendo Z, Q, I, T o L y X_1 - X_5 definidos como anteriormente.

25 La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa comprende preferentemente un dominio de flavodehidrogenasa modificada basado en uno de los dominios de flavodehidrogenasa no modificada de acuerdo con los aminoácidos 253-831 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 269-845 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 249-787 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 253-829 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 251-828 de la SEQ ID NO: 5, aminoácidos 251-829 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 233-771 de la SEQ ID NO: 7, aminoácidos 236-774 de la SEQ ID NO: 8, aminoácidos 235-773 de la SEQ ID NO: 9, aminoácidos 230-768 de la SEQ ID NO: 10. Preferentemente el dominio inventivo de flavodehidrogenasa modificada tiene una secuencia con al menos 50%, preferentemente al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, en particular se prefiere al menos 99%, de identidad de secuencia con uno de dichos dominios de flavodehidrogenasa no modificada y además comprende al menos una sustitución de aminoácidos en el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 o en el motivo NHW, adecuado para reducir la actividad de oxidación de glucosa y galactosa.

30 Preferentemente, el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 o asparagina en el motivo NHW es el aminoácido N723 de la SEQ ID NO: 1, N738 de la SEQ ID NO: 2, N718 de la SEQ ID NO: 3, N722 de la SEQ ID NO: 4, N721 de la SEQ ID NO: 5, N721 de la SEQ ID NO: 6, N704 de la SEQ ID NO: 7, N707 de la SEQ ID NO: 8, N706 de la SEQ ID NO: 9, N701 de la SEQ ID NO: 10.

35 Las CDH homólogas o los dominios de flavodehidrogenasa dentro de estos requisitos de secuencia se pueden identificar fácilmente mediante comparaciones de secuencia tales como la alineación de secuencia usando herramientas disponibles públicamente, tales como BLASTP, ClustalW o FastDB. Preferentemente, una CDH homóloga o modificada o el dominio de la misma tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, al menos 11, al menos 13, al menos 15, al menos 17, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 65, al menos 80, al menos 100 y/o hasta 100, hasta 80, hasta 60, hasta 50, hasta 40, hasta 30, hasta 30, hasta 20, hasta 15

sustituciones, deleciones, inserciones o modificaciones de aminoácidos adicionales, y cualquier intervalo entre estos valores, en comparación con cualquiera de las CDH de las SEQ ID NO: 1-10 o cualquiera de sus dominios de flavodehidrogenasa. Una base CDH preferida particular es de *N. crassa*, SEQ ID NO: 4. Otras "sustituciones, deleciones, inserciones de aminoácidos" no incluyen la sustitución en el N de N721 correspondiente a SEQ ID NO: 5 o en el motivo NHW. Se puede hacer una predicción de tales modificaciones mediante procedimientos computacionales que utilizan, por ejemplo, acoplamiento molecular en estructuras cristalinas como la entrada de base de datos PDB "1kdg".

El efecto de aminoácidos modificados adicionales en el sitio activo y el sitio de unión al sustrato se puede determinar para catálisis homogénea por procedimientos fotométricos y para catálisis heterogénea por mediciones electroquímicas usando electrodos enzimáticos, tal como se describe en la presente memoria.

Los procedimientos para una modificación adicional pueden ser conocidos en la técnica, tales como mutaciones de aminoácidos, que incluyen sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, pero también modificación/derivación química de cadenas laterales de aminoácidos.

La enzima o dominio inventivos generalmente se expresan de forma recombinante. También se proporcionan preparaciones que comprenden la CDH o dominio modificado. El término "enzima" o "preparación enzimática", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una celobiosa deshidrogenasa o su dominio de flavodehidrogenasa de un organismo específico que es al menos aproximadamente 20% puro, preferentemente al menos aproximadamente 40% puro, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 60 % puro, incluso más preferentemente al menos 80% puro y lo más preferentemente al menos 90% puro, según se determina por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

La presente divulgación se refiere a celobiosa deshidrogenasas modificadas/diseñadas genéticamente o al dominio de flavodehidrogenasa a partir de estructuras de proteínas existentes, que oxidan la glucosa y/o galactosa de manera menos eficiente con o sin un recambio de lactosa más eficiente que las celobiosa deshidrogenasas conocidas actualmente, especialmente aquellas que son más cercanas a la CDH modificada o al dominio de la flavodehidrogenasa, como un dominio de CDH o de flavodehidrogenasa de las de secuencias SEQ ID NO: 1-10 (las porciones para el dominio de la flavodehidrogenasa se proporcionan a continuación en la descripción de la Figura 1). Las constantes cinéticas de las enzimas responsables de este efecto son preferentemente un valor K_M más alto y un valor k_{cat} más bajo para glucosa y/o galactosa sola o en combinación con un valor K_M más bajo y un valor k_{cat} más alto para la lactosa que las enzimas actualmente caracterizadas.

Preferentemente, el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de lactosa es inferior a 10 mM, preferentemente según se determina con la CDH o dicho dominio está inmovilizado en un electrodo.

Preferentemente, el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de glucosa y/o galactosa es superior a 3 M o superior a 5 M, preferentemente según se determina con la CDH o dicho dominio está inmovilizado en un electrodo.

Por supuesto, la CDH modificada o el dominio de flavina todavía pueden tener actividad para una oxidación electrocatalítica de glucosa y/o galactosa. Es suficiente que se reduzca la dependencia de la concentración de la señal de glucosa y/o galactosa. Esencialmente, las señales de fondo constantes que dependen de glucosa y/o galactosa se pueden eliminar de la detección de lactosa por normalización. Con especial preferencia, el dominio de CDH o flavina tiene la propiedad de que una señal de glucosa y/o galactosa durante la detección de lactosa o la determinación de la concentración de lactosa es inferior al 5%; particularmente la señal, por ejemplo, La corriente de electrodo o la reducción electroquímica de un aceptor de electrones, de 20 g/l de glucosa y/o galactosa en una solución en comparación con la señal de una solución de lactosa de 20 g/l es inferior al 5%. En realizaciones preferentes de la invención, la actividad de oxidación de glucosa y/o galactosa de la CDH o del dominio se reduce en relación con la actividad de oxidación de lactosa. Con especial preferencia, la dependencia de la concentración de la oxidación de glucosa y/o galactosa se reduce de modo que, si hay glucosa y/o galactosa presentes, solo se detecta una contribución sustancialmente constante de glucosa y/o galactosa a la señal en relación con una señal de lactosa.

Se entiende que un experto en la técnica puede diseñar la celobiosa deshidrogenasa mencionada u otra para obtener la CDH modificada o el dominio de la flavodehidrogenasa activa utilizando los principios descritos en la presente memoria o en la técnica anterior (WO 2010/097462 A, WO2013/131942) como el diseño racional de enzimas a través de mutagénesis dirigida al sitio o enfoques de evolución dirigida (por ejemplo, transposición genética, PCR propensa a errores, etc.) y el posterior cribado de la diversidad generada. Las técnicas para introducir una mutación adicional en la secuencia de ácido nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido con el objetivo de intercambiar un aminoácido por otro en la proteína resultante se pueden lograr mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. Las posiciones de aminoácidos y la modificación para modificar una CDH pueden obtenerse mediante modelos de

homología utilizando la estructura cristalina de *Phanerochaete chrysosporium* CDH (entrada de la base de datos PDB 1kdg) como plantilla y superposición de los modelos obtenidos, así como estudios de acoplamiento. Es posible usar una CDH como plantilla y mediante comparación de secuencia para obtener los aminoácidos correspondientes para modificación para reducir la actividad de oxidación de glucosa y/o galactosa.

5

La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa se puede aislar por diafiltración, cromatografía de intercambio iónico y preferentemente purificarse adicionalmente por cromatografía de interacción hidrófoba. Preferentemente, la CDH o el dominio es producido de forma recombinante por *Pichia pastoris*.

10

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico que codifica una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa como se describió anteriormente. Las secuencias de CDH no modificadas son conocidas en la técnica, por ejemplo, en la base de datos de secuencias NCBI y divulgada en los documentos de patente WO 2010/097462 A y WO2013/131942. El ácido nucleico puede modificarse para codificar el dominio inventivo de CDH o flavina con la sustitución o mutación adicional. Los ácidos nucleicos, CDH o dominios descritos en la presente memoria pueden aislarse y/o purificarse.

15

Además, se proporciona un procedimiento de producción de una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de la invención, que comprende expresar de forma recombinante una molécula de ácido nucleico que codifica dicha CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa en una célula huésped.

20

En otro aspecto, la invención proporciona además un electrodo que comprende una celobiosa deshidrogenasa inmovilizada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de la invención.

25

Preferentemente, el electrodo comprende una CDH inmovilizada en modo de transferencia de electrones directa o mediada (Tasca et al. 2011a, Tasca et al. 2011b, Ludwig et al. 2010, Safina et al. 2010, Tasca et al. 2010a, Tasca et al. 2010b) o un dominio de flavodehidrogenasa inmovilizado en modo de transferencia mediada de electrones. Como electrodo, se entiende cualquier superficie adecuada para recoger electrones de CDH. El electrodo puede ser de cualquier material adecuado para inmovilizar la CDH, por ejemplo, carbono como grafito, grafito pirolítico, carbono vítreo, nanotubos de carbono (de pared simple o múltiple), fibras de carbono, diamante dopado con boro, electrodos de oro modificados con promotores, por ejemplo, tioles o electrodos serigrafados. Esta es una lista no exhaustiva de posibles electrodos, que pueden, por ejemplo, contener otras nanopartículas (oro, ...) para aumentar el área de superficie específica. Los usos particulares de los electrodos de la invención están en la provisión de biosensores, más específicamente a los biosensores de lactosa que usan las propiedades de transferencia directa de electrones (DET) de la celobiosa deshidrogenasa (CDH) o que usan propiedades de transferencia mediada de electrones (MET) para medir la concentración de lactosa a ácidos, pH neutro, alcalino.

30

35

En el electrodo, la CDH o el dominio de la flavodehidrogenasa pueden inmovilizarse por adsorción, preferentemente también atrapamiento físico en un polímero, formación compleja, preferentemente a través de un enlazador complejante adicional, unión covalente, en particular reticulación o unión iónica y/o la celobiosa deshidrogenasa inmovilizada puede ser reticulada, en particular por agentes bifuncionales, para aumentar la estabilidad o la actividad. Se ha demostrado que la reticulación con agentes bifuncionales, tales como agentes con dos grupos reactivos que hacen una conexión con la CDH, puede estabilizar la CDH e incluso aumentar su actividad en electrodos de grafito medibles por los procedimientos amperométricos descritos en la presente memoria. Esta ventaja puede conducir a una mayor sensibilidad y a reducir el límite de detección de lactosa. Tal agente de reticulación es, por ejemplo, glutaraldehído o cualquier otro dialdehído. Otros procedimientos para la inmovilización se describen, por ejemplo, en WO 2010/097462 y WO2013/131942, que se pueden usar de acuerdo con la invención.

40

45

Los electrodos se pueden usar en forma de un solo electrodo o pilas de electrodos, por ejemplo, de 2, 3, 4 o más electrodos.

50

Las configuraciones y usos de los electrodos, incluyendo los parámetros de medición, se describen, por ejemplo, en WO 2010/097462 y WO2013/131942, que se pueden usar de acuerdo con la invención.

55

La presente divulgación proporciona además un procedimiento de oxidación de la lactosa con el dominio inventivo de CDH o flavina, especialmente en un procedimiento de detección de o cuantificación de la lactosa en una muestra que comprende la etapa de oxidar lactosa en dicha muestra con una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa o un electrodo como se describe en la presente memoria y detecta o cuantifica dicha oxidación, preferentemente en el que dicha muestra comprende o se sospecha que comprende glucosa y/o galactosa. La muestra de fluido puede ser cualquier fluido que potencialmente comprenda lactosa, incluyendo leche o productos lácteos, como suero o queso. Si se analizan productos sólidos, como el queso, los carbohidratos, incluyendo la lactosa, pueden extraerse o el producto sólido puede fluidificarse, por ejemplo, mediante disolución.

60

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit de ensayo de lactosa que comprende la celobiosa deshidrogenasa modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa o un electrodo como se describe en la

65

presente memoria. El kit puede, en realizaciones preferentes, también comprender sustancias auxiliares, tales como tampones, y recipientes tales como medios de retención de muestras y/o patrones de lactosa. Se pueden usar patrones de lactosa para calibrar el ensayo. El kit también puede comprender un lector para una señal, especialmente una señal electroquímica tal como un potencióstato, un dispositivo de memoria legible por ordenador con software para calibración y/o cálculos de medición. La invención se puede definir por las siguientes realizaciones:

1. Una celobiosa deshidrogenasa (CDH) modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa que tiene una sustitución en el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 (CDH de *M. thermophilum*) por glutamina, isoleucina, treonina o leucina o una sustitución de asparagina en el motivo central activo que tiene la secuencia de aminoácidos NHW por glutamina, isoleucina, treonina o leucina.

2. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con 1, en la que el motivo del centro activo tiene la secuencia $X_1X_2NHWX_3X_4X_5$, en la que X_1 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de N, C y R; X_2 se selecciona de S y A; X_3 se selecciona de V, M e I; X_4 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de G y S; y X_5 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de S, A y T; especialmente preferido X_4 y X_5 no son ambos S.

3. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con 1 o 2, caracterizada porque la CDH es de *dikaryota*, preferentemente seleccionada de *ascomycota* o *basidiomycota*.

4. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con 3, caracterizada porque la CDH es una CDH modificada de una CDH de *Myriococcum thermophilum*, *Corynascus thermophilus*, *Chaetomium atrobrunneum* (*Myceliophthora fergusii*), *Hypoxylon haematostroma*, *Neurospora crassa* o *Stachybotrys bisbyi*, *Athelia rolfsii*, *Gelatorporia subvermispora*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*.

5. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 4, que comprende un dominio de flavodehidrogenasa modificada basado en uno de los dominios de flavodehidrogenasa no modificada de acuerdo con los aminoácidos 253-831 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 269-845 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 249-787 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 253-829 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 251-828 de la SEQ ID NO: 5, aminoácidos 251-829 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 233-771 de la SEQ ID NO: 7, aminoácidos 236-774 de la SEQ ID NO: 8, aminoácidos 235-773 de la SEQ ID NO: 9, aminoácidos 230-768 de la SEQ ID NO: 10;

dicho dominio de flavodehidrogenasa modificada tiene una secuencia con al menos 50%, preferentemente al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, en particular se prefiere al menos 99%, de identidad de secuencia con uno de dichos dominios de flavodehidrogenasa no modificada y además comprende la mutación de sustitución en el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 o en el motivo NHW.

6. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 5, en la que el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 o asparagina en el motivo NHW es el aminoácido N723 de la SEQ ID NO: 1, N738 de la SEQ ID NO: 2, N718 de la SEQ ID NO: 3, N722 de la SEQ ID NO: 4, N721 de la SEQ ID NO: 5, N721 de la SEQ ID NO: 6, N704 de la SEQ ID NO: 7, N707 de la SEQ ID NO: 8, N706 de la SEQ ID NO: 9, N701 de la SEQ ID NO: 10.

7. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 6, que se produce de forma recombinante por *Pichia pastoris*, se aísla por diafiltración, cromatografía de intercambio iónico y preferentemente se purifica adicionalmente por cromatografía de interacción hidrófoba.

8. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 7, caracterizada porque el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de lactosa es inferior a 10 mM, preferentemente según se determina con la CDH, o estando dicho dominio inmovilizado en un electrodo.

9. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 8, caracterizada porque el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de glucosa es superior a 3 M, preferentemente como se determina con la CDH, o estando dicho dominio inmovilizado en un electrodo.

10. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 9, caracterizada porque el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de galactosa es superior a 3 M, preferentemente como se determina con la CDH, o estando dicho dominio inmovilizado en un electrodo.

11. Una molécula de ácido nucleico que codifica una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 10.

12. Un procedimiento de producción de una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 10, que comprende expresar de forma recombinante una molécula de ácido nucleico de acuerdo con 11 en una célula huésped.

13. Un electrodo que comprende una celobiosa deshidrogenasa inmovilizada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 10;

preferentemente en el que la celobiosa deshidrogenasa se inmoviliza por adsorción, formación de complejo, con especial preferencia a través de un enlazador complejante adicional, enlace covalente o iónico, y/o en el

que preferentemente la celobiosa deshidrogenasa inmovilizada se reticula, en particular por agentes bifuncionales, para aumentar la estabilidad o actividad.

14. Un procedimiento de detección o cuantificación de lactosa en una muestra que comprende la etapa de oxidar lactosa en dicha muestra con una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con uno cualquiera de 1 a 10, o un electrodo de acuerdo con 13 y detectar o cuantificar dicha oxidación, preferentemente en el que dicha muestra comprende o se sospecha que comprende glucosa y/o galactosa, con especial preferencia una muestra que contiene leche o productos lácteos.

15. Un kit de ensayo de lactosa que comprende la celobiosa deshidrogenasa modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con cualquiera de los 1 a 10 o un electrodo de acuerdo con 13 y un medio de retención de muestras y/o estándares de lactosa.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes Figuras y ejemplos sin limitarse a los mismos.

Figuras

La **Figura 1** es una alineación de secuencias de aminoácidos de los dominios de flavodehidrogenasa ("dominios de flavina") de las CDH de tipo salvaje de *Chaetomium atrobrunneum* (aa 253-831 de la SEQ ID NO: 1), *Hypoxylon haematostroma* (aa 269-845 de la SEQ ID NO: 2), *Corynascus thermophilus* (aa 249-787 de la SEQ ID NO: 3), *Neurospora crassa* (aa 253-829 de la SEQ ID NO: 4), *Myriococcum thermophilum* (aa 251-828 de la SEQ ID NO: 5), *Stachybotrys bisbyi* (aa 251-829 de la SEQ ID NO: 6), *Athelia rolfsii* (aa 233-771 de la SEQ ID NO: 7), *Gelatoporia subvermispota* (aa 236-774 de la SEQ ID NO: 8), *Phanerochaete chrysosporium* (aa 235-773 de la SEQ ID NO: 9), *Trametes versicolor* (aa 230-768 de la SEQ ID NO: 10). El sitio de mutación correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 está resaltado y marcado con "+" (posición 483 de la numeración consensuada mostrada de los dominios de flavina mostrados).

La **Figura 2** proporciona curvas de calibración de lactosa de electrodos de detección que presentan CDH de *N. crassa* de tipo salvaje no modificada y CDH de *N. crassa* N722Q.

La **Figura 3** muestra el efecto de la adición de una solución de lactosa de 0,1 g con diferentes concentraciones de glucosa y galactosa cuando se usa CDH de *N. crassa* de tipo salvaje no modificada y CDH de *N. crassa* N722Q. La señal para la CDH de *N. crassa* de tipo salvaje no modificada es dependiente de glucosa y galactosa. La señal para la CDH de *N. crassa* N722Q no depende de la glucosa y la galactosa.

La **Figura 4** proporciona curvas de calibración de glucosa de electrodos de detección que presentan CDH de *N. crassa* de tipo salvaje no modificada y variante de CDH de *N. crassa*, CDH N722Q.

La **Figura 5** proporciona curvas de calibración de galactosa de electrodos de detección que presentan CDH de *N. crassa* de tipo salvaje no modificada y variante de CDH de *N. crassa*, CDH N722Q.

Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales

Los productos químicos utilizados en tampones y medios de fermentación eran productos comerciales y al menos de grado analítico, si no se indica lo contrario. Los sustratos para estudios cinéticos fueron lactosa, galactosa, glucosa y 2,6-dicloroindofenol (DCIP) de Sigma-Aldrich en el grado más alto de pureza disponible. Los tampones se prepararon usando agua purificada y desionizada (18 MΩ) con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).

Ejemplo 2: Ensayos de actividad enzimática y cinética en estado estable

La actividad enzimática se ensayó a 30 °C usando el DCIP (Karapetyan et al., 2005 Journal of Biotechnology 121:34-48) como aceptor de electrones. Las soluciones madre de carbohidratos usadas para mediciones cinéticas se prepararon en el tampón respectivo y se dejaron reposar durante la noche para la mutarotación, mientras que las soluciones madre de aceptores de electrones se prepararon en agua y se usaron inmediatamente. La estequiometría de reacción es de 1 para el receptor DCIP de dos electrones (1 mol de DCIP reducido por mol de carbohidrato oxidado). Las constantes cinéticas se calcularon ajustando los datos observados a la ecuación de Henri-Michaelis-Menten o al modelo adaptado para la inhibición del sustrato usando regresión no lineal por mínimos cuadrados y el programa SigmaPlot (Systat Software, San José, California, E.E. U.U.). La concentración de proteína se determinó con el ensayo de Bradford.

Ejemplo 3: Caracterización de proteínas

La concentración de proteína se determinó mediante el procedimiento de tinción con colorante de Bradford usando un ensayo prefabricado de Bio-Rad Laboratories Hercules, California, EE. UU.) y albúmina de suero bovino como estándar de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Para la caracterización electroforética, SDS-PAGE se realizó en una unidad de electroforesis vertical Hoefer SE 260 Mighty Small II. Los geles (10,5×10 cm; 10% T, 2,7% C) se moldearon y ejecutaron de acuerdo con las modificaciones del sistema Laemmli por parte de los fabricantes. Las bandas de proteínas en la SDS-PAGE se tiñeron con plata, las bandas en el gel IEF con azul de Coomassie R-250, de acuerdo con las instrucciones.

5

Ejemplo 4: Actividad de lactosa a glucosa/galactosa

El aminoácido N721 de la CDH de *M. therm.*, que forma parte del subsitio catalítico, cerca del anillo de isoaloxazina y completamente conservada entre las CDH, se seleccionó para la mutagénesis de saturación. Se utilizaron codones degenerados del tipo NNS. La biblioteca mutante correspondiente se transformó en *S. cerevisiae* y se expresó bajo el control del promotor GAL 1 en cuatro placas de 96 pocillos. Cada placa contenía 88 variantes y se inocularon 8 pocillos con el tipo salvaje como control. Las bibliotecas se seleccionaron dos veces para determinar la actividad de CDH con el ensayo basado en DCIP usando lactosa o glucosa como sustrato. Los 11 transformantes que mostraron una relación aumentada de actividad de lactosa a glucosa se enviaron para secuenciar para identificar la mutación beneficiosa. La Tabla 1 muestra los resultados de la detección y los intercambios de aminoácidos identificados. Las variantes seleccionadas mostraron un aumento en la actividad de lactosa mientras que la actividad de glucosa se redujo drásticamente en comparación con el tipo salvaje.

10

15

Tabla 1. Actividad de lactosa a glucosa/galactosa
Relación de act. DCIP (Δ Abs. h^{-1})

20

	30 mM Lactosa	50 mM Glucosa	Lactosa/Glucosa	Intercambio de aminoácidos
<i>Peso (prom.)</i>	1,7	0,27	6,3	ninguno
25 Placa 1 D05	4,7	0,03	156	Q
Placa 1 G11	4,6	0,02	230	Q
Placa 2 B05	3,8	0,02	190	I
Placa 2 E05	5,9	0,01	590	I
30 Placa 2 G05	3,8	0,01	380	T
Placa 2 F07	3,8	0,04	95	T
Placa 3 A11	5,0	0,11	45	Q
Placa 3 C10	4,8	0,02	240	L
35 Placa 3 H11	5,6	0,02	280	Q
Placa 4 G08	4,7	0,02	235	Q
Placa 4 G10	4,7	0,01	470	Q

40

La actividad en galactosa se parecía a los resultados en glucosa.

Ejemplo 5: Generación de variantes de CDH de *Neurospora crassa* por mutagénesis dirigida al sitio

El plásmido pNCIIA previamente reportado, que codifica el gen CDH de *N. crassa* (XM_951498, SEQ ID NO: 12 del documento de patente WO 2010/097462, incorporado por referencia en la presente) se usó como plantillas para la amplificación del gen diana con los cebadores 5NCa-BstBI (5'-TATTTTCGAAACGATGAGGACCACCTCGGCC-3', SEQ ID NO: 11) y 3NCa-XbaI (5'-TATCACGTGCTACACACTGCCAATACC-3', SEQ ID NO: 12). La PCR se realizó con el ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion de New England BioLabs, una mezcla de desoxinucleósido trifosfato (dNTP) de Fermentas, cebadores oligonucleotídicos de VBC Biotech (Viena, Austria) y un termociclador C-1000 de Bio-Rad Laboratories. El fragmento de PCR resultante se digirió con BstBI y XbaI y se clonó en el vector igualmente tratado pPICZ α A. El procedimiento dio como resultado un gen que codifica una proteína con sus secuencias de señal nativas clonadas bajo el control del promotor AOX1 inducible por metanol. Se omitieron las etiquetas C-terminales para la purificación o detección de anticuerpos. La correcta inserción de los genes y la ausencia de mutaciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN. Los plásmidos lineales verificados se usaron para la transformación en células electrocompetentes de *P. pastoris* y los transformantes se seleccionaron en placas YPD Zeocin (1 mg l^{-1}).

45

50

55

60

Ejemplo 6: Producción de CDH recombinante

La CDH recombinante de tipo salvaje, así como la variante, se produjeron en matraces con deflector de 1 l. Los precltivos se cultivaron durante la noche en 30 ml de medio YPD a 30 °C y 120 rpm. Después de aproximadamente 18 horas, los precltivos se transfirieron a matraces con deflectores de 1 litro que contenían 200 ml de medio BMGY sin metanol. La inducción con metanol se inició inmediatamente usando una bomba peristáltica multicanal

65

(Minipuls Evolution, Gilson, Middleton, WI, EE. UU.). Cada matraz se suministró metanol ocho veces al día produciendo una concentración total de metanol al 2% (v/v) por día. El aumento de la actividad se controló usando el DCIP y los ensayos de enzimas citocromo c. El cultivo se detuvo en el quinto día de inducción de metanol, las células se eliminaron por centrifugación (4000 rpm, 20 min) y el sobrenadante se ajustó a una concentración final de sulfato de amonio del 20%.

Ejemplo 7: Purificación de CDH recombinante

Las enzimas se purificaron hasta homogeneidad en una purificación de dos etapas. La muestra se cargó en una columna de 20 ml de PHE Sepharose FF (HR26/20) equilibrada con tampón de acetato de Na 50 mM pH 5,5 que contenía sulfato de amonio al 20%. Las proteínas se eluyeron aumentando la concentración del tampón de elución (tampón de acetato de Na 50 mM, pH 5,5) de 0 a 100% en 5 volúmenes de columna y se agruparon las fracciones que contenían actividad de CDH. Después de la diafiltración con un módulo de flujo cruzado de pila plana de polietersulfona con un límite de 10 kDa (Viva Flow 50, Sartorius, Göttingen, Alemania) hasta una conductividad de 5 mS cm⁻¹ en acetato de Na 20 mM pH 5,5 las muestras se cargaron en una columna Q-Source de 20 ml (HR26/20) equilibrada con un tampón de acetato de Na 20 mM, pH 5,5. La CDH se eluyó aumentando la concentración del tampón de elución (tampón de acetato de Na 50 mM, pH 5,5 que contenía 0,5 M de NaCl) del 0 al 100% en 50 volúmenes de columna. Las fracciones se probaron para determinar la actividad de CDH y se agruparon de acuerdo con el Reinheitszahl más alto (RZ, calculado a partir de la relación de absorbancia 420 nm/280 nm). Las enzimas purificadas se concentraron y se diafiltraron en 50 mM de tampón citrato, pH 5,5, se dividieron en alícuotas y se mantuvieron a 4 °C para su uso posterior.

Ejemplo 8: Mediciones electroquímicas

Se conectó un electrodo serigrafiado con una configuración de tres electrodos (Dropsens, Oviedo, España) a un potencióstato Autolab (PGSTAT204, Metrohm Autolab B. V., Utrecht, Países Bajos) y se usó para mediciones electroquímicas. Los electrodos serigrafiados modificados con enzimas (DropSens, Oviedo, España) se montaron usando un portaelectrodos (DropSens, Oviedo, España) en un vaso de precipitados lleno de 50 ml de tampón de medición y, opcionalmente, concentraciones variables de glucosa. El sistema fue controlado por el software NOVA versión 1.11.0 (Metrohm Autolab B. V., Utrecht, Países Bajos).

Ejemplo 9: CDH mutada de *N. crassa* - glucosa reducida, actividad de galactosa

La CDH de *N. crassa* oxida la glucosa y la galactosa (Harreither et al., 2007), lo que tiene efectos secundarios negativos en la precisión de la detección de lactosa si hay glucosa y galactosa. Para reducir la actividad con glucosa y galactosa, se usó CDH de *N. crassa* como un andamiaje de proteínas para el cual las actividades de glucosa y galactosa se redujeron considerablemente. La variante enzimática N722Q se produjo de forma heteróloga en *P. pastoris* de acuerdo con las rutinas explicadas y se comparó con la CDH recombinante de tipo salvaje de *N. crassa*. Los pesos moleculares no diferían significativamente de la enzima nativa producida por el hongo. Para investigar el efecto de la mutación en la variante de *N. crassa*, se realizó una caracterización completa de las constantes en estado estable (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Constantes cinéticas aparentes de wtCDH para donantes de electrones indicados en 100 mM de tampón Mcllvaine a pH 5,5 utilizando DCIP como aceptor de electrones artificial

Enzima	Sustrato (Donantes de electrones)	K _m Medio (mM) ± SD	V _{max} Medio (U/mg) ± SD	k _{cat} Medio (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m Medio (mM ⁻¹ s ⁻¹)
wtCDH	Lactosa	0,154 ± 0,01	18,2 ± 0,56	25,78	167,4
	Glucosa ^a	2039 ± 0,41	20,3 ± 2,34	28,76	12,03
	Galactosa ^a	26,5 ± 6,85	6,33 ± 1,57	8,97	3,75

^a Valores K_m y k_{cat} extrapolados.

Tabla 3. Constantes cinéticas aparentes del sensor de *N. crassa* N722Q para donantes de electrones indicados en 100 mM de tampón Mcllvaine a pH 5,5 utilizando DCIP como aceptor de electrones artificial

Enzima	Sustrato (Donantes de electrones)	K_m Medio (mM) \pm SD	V_{max} Medio (U/mg) \pm SD	k_{cat} Medio (s^{-1})	k_{cat}/K_m Medio ($mM^{-1} s^{-1}$)
N722Q	Lactosa Glucosa ^a	$2,18 \pm 0,28 > 10 M^b$	$55,0 \pm 2,0$	77,92	35,74
	Galactosa ^a	$> 10 M^b$	No se pudieron calcular los datos ^b		

^a Valores K_m y k_{cat} extrapolados.
^b No se pudieron analizar los datos, ya que todavía estaban ubicados dentro del intervalo lineal.

Las constantes en la Tabla 3 muestran con más detalle que la actividad de oxidación de glucosa y galactosa se suprime en la variante de CDH de *N. crassa*.

Ejemplo 10: CDH mutada de *N. crassa* - rendimiento del electrodo

Para probar la variante modificada de CDH de *N. crassa* se inmovilizó en un electrodo de grafito y se midieron las respuestas actuales en diferentes concentraciones de glucosa, galactosa y lactosa. Las Figuras 2-5 muestran la influencia de diferentes concentraciones de glucosa o galactosa en las mediciones de lactosa. A diferencia de la CDH de tipo salvaje, en las mediciones de lactosa no se pudo detectar una influencia significativa de glucosa y galactosa en las mediciones con las variantes de CDH modificadas.

Referencias

Gao et al. (2001) Plos Genetics, 7 (1): e1001264
 Harreither et al. (2011) Appl. Environ. Microbiol. 77:1804-1815.
 Ludwig et al. (2010) Chem. Phys. Chem. 11:2674-2697
 Safina et al. (2010) Electrochimica Acta 55: 7690-7695.
 Tasca et al. (2010) Bioelect. 25:1710-1716.
 Tasca et al. (2010b) Bioelect. 25:1710-1716.
 Tasca et al. (2011) Anal. Chem. 83:3042-3049.
 Tasca et al. (2011b). Analyst 136:2033-2036.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Directsens GmbH
- <120> Celobiosa deshidrogenasa mutada con sustrato modificado
- <130> r70421
- <150> EP16152770.0
- <151> 2016-01-26
- <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 770 603 T3

<210> 1
 <211> 831
 <212> PRT
 <213> *Chaetomium atrobrunneum*

5 <400> 1
 1 Met Arg Pro Ser Ser Arg Phe Val Gly Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ser
 5 10 15
 10 Phe Leu Pro Ser Ala Leu Ala Gln Asn Asn Ala Ala Val Thr Phe Thr
 20 25 30
 15 Asp Pro Asp Thr Gly Ile Val Phe Asn Ser Trp Gly Leu Ala Asn Gly
 35 40 45
 20 Ala Pro Gln Thr Gln Gly Gly Phe Thr Phe Gly Val Ala Leu Pro Ser
 50 55 60
 25 Asp Ala Leu Thr Thr Asp Ala Thr Glu Phe Ile Gly Tyr Leu Glu Cys
 65 70 75 80
 30 Ala Ser Ala Asp Asn Gln Gly Trp Cys Gly Val Ser Met Gly Gly Pro
 85 90 95
 35 Met Thr Asn Ser Leu Leu Ile Thr Ala Trp Pro His Glu Asp Asn Val
 100 105 110
 40 Tyr Thr Ser Leu Arg Phe Ala Thr Gly Tyr Ala Met Pro Asp Val Tyr
 115 120 125
 45 Ser Gly Asp Ala Thr Ile Thr Gln Ile Ser Ser Ser Ile Asn Ala Thr
 130 135 140
 50 His Phe Lys Leu Ile Phe Arg Cys Gln Asn Cys Leu Gln Trp Thr His
 145 150 155 160
 Asp Gly Ala Ser Gly Gly Ala Ser Thr Ser Ala Gly Val Leu Val Leu

ES 2 770 603 T3

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

ES 2 770 603 T3

	Ser	Ser	Pro	Asp	Lys	Lys	Asn	Arg	Thr	Phe	Ser	Asn	Ala	Pro	Phe	Met
				420					425					430		
5	Phe	Ser	Gly	Gly	Glu	Arg	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Thr	Tyr	Leu	Thr	Ser
			435					440					445			
10	Ala	Lys	Lys	Arg	Ser	Asn	Phe	Asn	Leu	Trp	Leu	Asn	Thr	Ser	Val	Lys
		450					455					460				
15	Arg	Val	Ile	Arg	Glu	Gly	Gly	His	Val	Thr	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Pro
	465				470						475					480
20	Phe	Arg	Thr	Gly	Gly	Tyr	Gln	Gly	Ile	Val	Asn	Val	Thr	Ala	Val	Ser
				485						490					495	
25	Gly	Arg	Val	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Ile	Leu
			500						505					510		
30	Leu	Arg	Gly	Gly	Ile	Gly	Pro	Ala	Asp	Gln	Leu	Glu	Val	Val	Lys	Ala
			515					520					525			
35	Ser	Lys	Ile	Asp	Gly	Pro	Thr	Met	Ile	Ser	Asn	Ala	Ser	Trp	Ile	Pro
		530					535					540				
40	Leu	Pro	Val	Gly	Tyr	Asn	Leu	Asp	Asp	His	Leu	Asn	Thr	Asp	Thr	Val
	545					550					555					560
45	Ile	Thr	His	Pro	Asp	Val	Ala	Phe	Tyr	Asp	Phe	Tyr	Glu	Ala	Trp	Asn
					565					570					575	
50	Thr	Pro	Ile	Glu	Ala	Asp	Lys	Asn	Ser	Tyr	Leu	Ser	Ser	Arg	Thr	Gly
			580						585					590		
55	Ile	Leu	Ala	Gln	Ala	Ala	Pro	Asn	Ile	Gly	Pro	Met	Met	Trp	Glu	Glu
			595					600					605			
60	Ile	Lys	Gly	Ala	Asp	Gly	Ile	Val	Arg	Gln	Leu	Gln	Trp	Thr	Ala	Arg
		610					615					620				
65	Val	Glu	Gly	Ser	Phe	Asp	Thr	Pro	Asn	Gly	Gln	Ala	Met	Thr	Ile	Ser
	625					630					635					640
70	Gln	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly	Arg	Met	Thr	Ile	Thr
					645					650					655	
75	Pro	Ser	Leu	Thr	Thr	Val	Val	Ser	Asp	Val	Pro	Tyr	Leu	Lys	Asp	Pro
				660					665					670		

ES 2 770 603 T3

	Asn	Asp	Lys	Glu	Ala	Val	Ile	Gln	Gly	Ile	Val	Asn	Leu	Gln	Asn	Ala
			675					680					685			
5	Leu	Lys	Asn	Val	Ala	Gly	Leu	Thr	Trp	Thr	Tyr	Pro	Asn	Ser	Ser	Ile
		690					695					700				
10	Thr	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asp	Asn	Met	Val	Val	Ser	Pro	Ser	Asn	Arg
	705					710					715					720
15	Arg	Ala	Asn	His	Trp	Met	Gly	Thr	Ala	Lys	Ile	Gly	Thr	Asp	Asp	Gly
				725						730					735	
20	Arg	Leu	Ala	Gly	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Thr	Lys	Val	Tyr
			740						745					750		
25	Gly	Thr	Asp	Asn	Leu	Phe	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Pro	Gly	Thr
			755					760					765			
30	Pro	Thr	Thr	Asn	Pro	Ser	Ala	Tyr	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	Glu	His	Ala
		770					775					780				
35	Ser	Gln	Arg	Ile	Leu	Gly	Leu	Ala	Ala	Pro	Lys	Pro	Val	Gly	Lys	Trp
	785					790					795					800
40	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly	Arg	Gln	Trp	Thr	Gly	Ser	Phe	Gln	Cys	Val	Ser
				805						810					815	
40	Gly	Thr	Lys	Cys	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Trp	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu	
			820						825					830		

ES 2 770 603 T3

<210> 2
<211> 845
<212> PRT
<213> Hypoxylon haematostroma

5

<400> 2

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

ES 2 770 603 T3

	Val	Ala	Leu	Pro	Glu	Asn	Ala	Leu	Thr	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Leu	Ile
	65					70					75					80
5	Gly	Tyr	Leu	Lys	Cys	Gly	Ser	Asn	Gly	Thr	Thr	Thr	Asp	Ala	Trp	Cys
					85					90					95	
10	Gly	Leu	Ser	Phe	Gly	Gly	Pro	Met	Thr	Asn	Ser	Leu	Leu	Leu	Met	Ala
				100					105					110		
15	Trp	Pro	His	Glu	Asp	Glu	Ile	Leu	Thr	Ser	Phe	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly
			115					120					125			
20	Tyr	Thr	Arg	Pro	Asp	Leu	Tyr	Thr	Gly	Asp	Ala	Lys	Leu	Thr	Gln	Ile
		130					135					140				
25	Ser	Ser	Thr	Ile	Asp	Lys	Asp	His	Phe	Thr	Leu	Ile	Phe	Arg	Cys	Gln
	145					150					155					160
30	Asn	Cys	Leu	Ala	Trp	Asn	Gln	Asp	Gly	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Thr
					165					170					175	
35	Ser	Ala	Gly	Ser	Leu	Ile	Leu	Gly	Trp	Ala	Ser	Ala	Leu	Arg	Ala	Pro
				180					185					190		
40	Thr	Asn	Ala	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Ile	Asn	Phe	Asn	Phe	His	Asn	Asn
			195					200					205			
45	Gly	Gln	Met	Ile	Trp	Gly	Ala	Thr	Leu	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Asn	Pro
		210					215					220				
50	Ser	Tyr	Ser	Glu	Trp	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Gly	Asp
	225					230				235					240	
55	Cys	Gly	Gly	Ala	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Val
				245						250					255	
60	Pro	Thr	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Val	Pro	Thr	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Ile
			260						265					270		
65	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ile	Pro	Leu	Ala	Asp	Lys	Leu	Ser
			275					280					285			
70	Glu	Ala	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Ile	Glu	Lys	Gly	Pro	Pro	Ser	Ser
		290					295					300				
75	Gly	Arg	Trp	Gly	Gly	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Trp	Leu	Lys	Asp	Thr	Asn
	305					310					315					320

ES 2 770 603 T3

Leu Thr Arg Phe Asp Val Pro Gly Leu Cys Asn Glu Ile Trp Val Asn
 325 330 335
 5 Ser Ala Gly Val Ala Cys Thr Asp Thr Asp Gln Met Ala Gly Cys Val
 340 345 350
 10 Leu Gly Gly Gly Thr Ala Val Asn Ala Gly Leu Trp Trp Lys Pro Tyr
 355 360 365
 15 Asn Leu Asp Trp Asp Tyr Asn Phe Pro Arg Gly Trp Lys Ser Arg Asp
 370 375 380
 20 Met Ala Ala Ala Thr Arg Arg Val Phe Ser Arg Ile Pro Gly Thr Asp
 385 390 395 400
 25 Asn Pro Ser Met Asp Gly Lys Arg Tyr Leu Gln Gln Gly Phe Glu Ile
 405 410 415
 30 Leu Ala Gly Gly Leu Lys Ala Ala Gly Trp Thr Glu Val Thr Ala Asn
 420 425 430
 35 Asp Ala Pro Asn Lys Lys Asn His Thr Tyr Ser His Ser Pro Phe Met
 435 440 445
 40 Phe Ser Gly Gly Glu Arg Gly Gly Pro Met Gly Thr Tyr Leu Val Ser
 450 455 460
 45 Ala Ser Arg Arg Lys Asn Phe His Leu Trp Thr Gly Thr Ala Val Lys
 465 470 475 480
 50 Arg Val Val Arg Thr Gly Gly His Ile Thr Gly Leu Glu Val Glu Pro
 485 490 495
 55 Phe Val Asn Gly Gly Tyr Thr Gly Val Val Asn Val Thr Ser Ile Thr
 500 505 510
 60 Gly Arg Val Val Leu Ser Ala Gly Ala Phe Gly Ser Ala Lys Ile Leu
 515 520 525
 65 Leu Arg Ser Gly Ile Gly Pro Glu Asp Gln Leu Glu Ile Val Lys Ser
 530 535 540
 Ser Thr Asp Gly Pro Thr Met Ile Ser Asp Ser Ser Trp Ile Thr Leu
 545 550 555 560
 Pro Val Gly Tyr Asn Leu Glu Asp His Thr Asn Thr Asp Thr Val Val

ES 2 770 603 T3

	565					570					575					
5	Thr	His	Pro	Asp	Val	Val	Phe	Tyr	Asp	Phe	Tyr	Glu	Ala	Gly	His	Pro
				580					585					590		
10	Asn	Val	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Tyr	Leu	Asn	Ser	Arg	Ala	Gly	Ile	Leu
			595					600					605			
15	Ala	Gln	Ala	Ala	Pro	Asn	Ile	Gly	Pro	Met	Phe	Trp	Glu	Glu	Ile	Lys
		610					615					620				
20	Gly	Lys	Asp	Gly	Val	Val	Arg	Gln	Leu	Gln	Trp	Thr	Ala	Arg	Val	Glu
	625					630					635					640
25	Gly	Ser	Ala	Gly	Thr	Pro	Asn	Gly	Tyr	Ala	Met	Thr	Met	Ser	Gln	Tyr
					645					650					655	
30	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Arg	Gly	Arg	Met	Thr	Ile	Thr	Lys	Ala
				660					665					670		
35	Leu	Thr	Thr	Val	Val	Ser	Thr	Val	Pro	Tyr	Leu	Gln	Asp	Lys	Asn	Asp
			675					680					685			
40	Val	Glu	Ala	Val	Ile	Gln	Gly	Ile	Lys	Asn	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Ser
		690					695					700				
45	Asn	Val	Lys	Asn	Leu	Thr	Trp	Thr	Tyr	Pro	Pro	Ser	Asn	Thr	Thr	Val
	705					710					715					720
50	Glu	Asp	Phe	Val	Asn	Asn	Met	Leu	Val	Ser	Tyr	Thr	Asn	Arg	Arg	Ser
					725					730					735	
55	Asn	His	Trp	Ile	Gly	Thr	Asn	Lys	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp	Gly	Arg	Ser
				740					745					750		
60	Arg	Gly	Gly	Ser	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Thr	Lys	Val	Tyr	Gly	Thr
			755					760					765			
65	Asp	Asn	Leu	Phe	Val	Val	Asp	Ala	Gly	Ile	Phe	Pro	Gly	His	Ile	Thr
		770					775					780				
70	Thr	Asn	Pro	Thr	Ser	Tyr	Ile	Val	Ile	Ala	Ala	Glu	Arg	Ala	Ser	Glu
	785					790						795				800
75	Arg	Ile	Leu	Asp	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Ala	Gln	Pro	Arg	Phe	Ala	Gln
					805					810					815	

ES 2 770 603 T3

Cys Gly Gly Arg Thr Trp Thr Gly Ser Phe Gln Cys Ala Ala Pro Tyr
 820 825 830

5 Thr Cys Gln Tyr Arg Asn Glu Arg Tyr Ser Gln Cys Arg
 835 840 845

<210> 3
 <211> 787
 <212> PRT
 <213> *Corynascus thermophilus*

<400> 3

15 Met Lys Leu Leu Ser Arg Val Gly Ala Thr Ala Leu Ala Ala Thr Leu
 1 5 10 15

20 Ser Leu Lys Gln Cys Ala Ala Gln Met Thr Glu Gly Thr Tyr Thr His
 20 25 30

25 Glu Ala Thr Gly Ile Thr Phe Lys Thr Trp Thr Pro Ser Asp Gly Ser
 35 40 45

30 Thr Phe Thr Phe Gly Leu Ala Leu Pro Gly Asp Ala Leu Thr Asn Asp
 50 55 60

35 Ala Thr Glu Tyr Ile Gly Leu Leu Arg Cys Gln Ile Thr Asp Pro Ser
 65 70 75 80

40 Ser Pro Gly Tyr Cys Gly Ile Ser His Gly Gln Ser Gly Gln Met Thr
 85 90 95

45 Gln Ala Leu Leu Leu Val Ala Trp Ala Ser Glu Asp Val Val Tyr Thr
 100 105 110

50 Ser Phe Arg Tyr Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Pro Glu Leu Tyr Thr Gly
 115 120 125

55 Asp Ala Lys Leu Thr Gln Ile Ala Ser Ser Val Ser Gly Asp Ser Phe
 130 135 140

60 Glu Val Leu Phe Arg Cys Glu Asn Cys Phe Ser Trp Asp Gln Asn Gly
 145 150 155 160

Ala Thr Gly Ser Val Ser Thr Ser Asn Gly Ala Leu Val Leu Gly Tyr
 165 170 175

Ala Ala Ser Lys Ser Gly Leu Thr Gly Ala Thr Cys Pro Asp Thr Ala
 180 185 190

ES 2 770 603 T3

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

ES 2 770 603 T3

Ser Asn Phe Asn Leu Trp Val Asn Thr Ser Val Arg Arg Ala Ile Arg
 450 455 460
 5 Thr Gly Pro Arg Val Ser Gly Val Glu Leu Glu Cys Leu Ala Asp Gly
 465 470 475 480
 10 Gly Phe Asn Gly Thr Val Asn Leu Lys Glu Gly Gly Gly Val Ile Phe
 485 490 495
 15 Ser Ala Gly Ala Phe Gly Ser Ala Lys Leu Leu Leu Arg Ser Gly Ile
 500 505 510
 20 Gly Pro Glu Asp Gln Leu Glu Ile Val Ala Ser Ser Lys Asp Gly Glu
 515 520 525
 25 Thr Phe Ile Ser Lys Asn Asp Trp Ile Lys Leu Pro Val Gly His Asn
 530 535 540
 30 Val Phe Tyr Asp Phe Tyr Ala Ala Trp Asp Asn Pro Ile Thr Glu Asp
 565 570 575
 35 Lys Glu Ala Tyr Leu Asn Ser Arg Ser Gly Ile Leu Ala Gln Ala Ala
 580 585 590
 40 Pro Asn Ile Gly Pro Leu Met Trp Glu Glu Val Thr Pro Ser Asp Gly
 595 600 605
 45 Ile Thr Arg Gln Phe Gln Trp Thr Cys Arg Val Glu Gly Asp Ser Ser
 610 615 620
 50 Lys Thr Asn Ser Thr His Ala Met Thr Leu Ser Gln Tyr Leu Gly Arg
 625 630 635 640
 55 Gly Val Val Ser Arg Gly Arg Met Gly Ile Thr Ser Gly Leu Thr Thr
 645 650 655
 60 Thr Val Ala Glu His Pro Tyr Leu His Asn Asp Gly Asp Leu Glu Ala
 660 665 670
 65 Val Ile Gln Gly Ile Gln Asn Val Val Asp Ala Leu Ser Gln Val Pro
 675 680 685
 Asp Leu Glu Trp Val Leu Pro Pro Pro Asn Thr Thr Val Glu Glu Tyr
 690 695 700

ES 2 770 603 T3

	Val	Asn	Ser	Leu	Ile	Val	Ser	Pro	Ala	Asn	Arg	Arg	Ala	Asn	His	Trp
	705					710					715					720
5	Met	Gly	Thr	Ala	Lys	Met	Gly	Leu	Asp	Asp	Gly	Arg	Ser	Gly	Gly	Ser
					725					730					735	
10	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Asn	Thr	Lys	Val	Tyr	Gly	Thr	Asp	Asn	Leu	Phe
				740					745					750		
15	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Pro	Gly	Met	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	Ser
			755					760					765			
20	Ala	Met	Ile	Val	Ile	Val	Ala	Glu	Gln	Ala	Ala	Gln	Arg	Ile	Leu	Ser
		770					775					780				
	Leu	Arg	Tyr													
	785															
25	<210>	4														
	<211>	829														
	<212>	PRT														
	<213>	Neurospora crassa														
30	<400>	4														
	Met	Arg	Thr	Thr	Ser	Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Val	Ala	Ser
	1				5					10					15	
35	Leu	Leu	Ser	Pro	Ala	Phe	Ala	Gln	Thr	Ala	Pro	Lys	Thr	Phe	Thr	His
				20					25					30		
40	Pro	Asp	Thr	Gly	Ile	Val	Phe	Asn	Thr	Trp	Ser	Ala	Ser	Asp	Ser	Gln
			35					40					45			
45	Thr	Lys	Gly	Gly	Phe	Thr	Val	Gly	Met	Ala	Leu	Pro	Ser	Asn	Ala	Leu
		50					55					60				
50	Thr	Thr	Asp	Ala	Thr	Glu	Phe	Ile	Gly	Tyr	Leu	Glu	Cys	Ser	Ser	Ala
	65					70					75					80
55	Lys	Asn	Gly	Ala	Asn	Ser	Gly	Trp	Cys	Gly	Val	Ser	Leu	Arg	Gly	Ala
					85					90					95	
60	Met	Thr	Asn	Asn	Leu	Leu	Ile	Thr	Ala	Trp	Pro	Ser	Asp	Gly	Glu	Val
				100					105					110		
	Tyr	Thr	Asn	Leu	Met	Phe	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ala	Met	Pro	Lys	Asn	Tyr
			115					120					125			

ES 2 770 603 T3

	Ala	Gly	Asp	Ala	Lys	Ile	Thr	Gln	Ile	Ala	Ser	Ser	Val	Asn	Ala	Thr
		130					135					140				
5	His	Phe	Thr	Leu	Val	Phe	Arg	Cys	Gln	Asn	Cys	Leu	Ser	Trp	Asp	Gln
	145					150					155					160
10	Asp	Gly	Val	Thr	Gly	Gly	Ile	Ser	Thr	Ser	Asn	Lys	Gly	Ala	Gln	Leu
					165					170					175	
15	Gly	Trp	Val	Gln	Ala	Phe	Pro	Ser	Pro	Gly	Asn	Pro	Thr	Cys	Pro	Thr
				180					185					190		
20	Gln	Ile	Thr	Leu	Ser	Gln	His	Asp	Asn	Gly	Met	Gly	Gln	Trp	Gly	Ala
			195					200					205			
25	Ala	Phe	Asp	Ser	Asn	Ile	Ala	Asn	Pro	Ser	Tyr	Thr	Ala	Trp	Ala	Ala
		210					215					220				
30	Lys	Ala	Thr	Lys	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Cys	Ser	Gly	Pro	Val	Thr	Thr
	225					230					235					240
35	Ser	Ile	Ala	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Phe	Asp	Tyr	Ile
					245					250					255	
40	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ile	Pro	Val	Ala	Asp	Lys	Leu	Ser
					260				265					270		
45	Glu	Ser	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Ile	Glu	Lys	Gly	Phe	Ala	Ser	Thr
			275					280					285			
50	Gly	Glu	His	Gly	Gly	Thr	Leu	Lys	Pro	Glu	Trp	Leu	Asn	Asn	Thr	Ser
		290					295					300				
55	Leu	Thr	Arg	Phe	Asp	Val	Pro	Gly	Leu	Cys	Asn	Gln	Ile	Trp	Lys	Asp
	305					310					315					320
60	Ser	Asp	Gly	Ile	Ala	Cys	Ser	Asp	Thr	Asp	Gln	Met	Ala	Gly	Cys	Val
				325						330					335	
65	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Trp	Tyr	Lys	Pro	Tyr
				340					345					350		
70	Thr	Lys	Asp	Trp	Asp	Tyr	Leu	Phe	Pro	Ser	Gly	Trp	Lys	Gly	Ser	Asp
			355					360					365			
75	Ile	Ala	Gly	Ala	Thr	Ser	Arg	Ala	Leu	Ser	Arg	Ile	Pro	Gly	Thr	Thr

ES 2 770 603 T3

	370					375						380				
5	Thr 385	Pro	Ser	Gln	Asp	Gly 390	Lys	Arg	Tyr	Leu	Gln 395	Gln	Gly	Phe	Glu	Val 400
10	Leu	Ala	Asn	Gly	Leu 405	Lys	Ala	Ser	Gly	Trp 410	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Leu 415
15	Lys	Asp	Ser	Glu 420	Gln	Lys	Asn	Arg	Thr 425	Phe	Ser	His	Thr	Ser	Tyr	Met 430
20	Tyr	Ile	Asn 435	Gly	Glu	Arg	Gly	Gly 440	Pro	Leu	Ala	Thr	Tyr 445	Leu	Val	Ser
25	Ala	Lys 450	Lys	Arg	Ser	Asn	Phe 455	Lys	Leu	Trp	Leu	Asn 460	Thr	Ala	Val	Lys
30	Arg 465	Val	Ile	Arg	Glu	Gly 470	Gly	His	Ile	Thr	Gly 475	Val	Glu	Val	Glu	Ala 480
35	Phe	Arg	Asn	Gly	Gly 485	Tyr	Ser	Gly	Ile	Ile 490	Pro	Val	Thr	Asn	Thr	Thr 495
40	Gly	Arg	Val	Val 500	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr 505	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys 510	Ile	Leu
45	Leu	Arg	Ser 515	Gly	Ile	Gly	Pro	Lys 520	Asp	Gln	Leu	Glu	Val 525	Val	Lys	Ala
50	Ser	Ala 530	Asp	Gly	Pro	Thr	Met 535	Val	Ser	Asn	Ser	Ser 540	Trp	Ile	Asp	Leu
55	Pro	Val	Gly	His	Asn 545	Leu	Val 550	Asp	His	Thr	Asn 555	Thr	Asp	Thr	Val	Ile 560
60	Gln	His	Asn	Asn 565	Val	Thr	Phe	Tyr	Asp 570	Phe	Tyr	Lys	Ala	Trp	Asp 575	Asn
65	Pro	Asn	Thr	Thr 580	Asp	Met	Asn	Leu	Tyr 585	Leu	Asn	Gly	Arg	Ser	Gly	Ile 590
70	Phe	Ala	Gln	Ala	Ala 595	Pro	Asn	Ile	Gly 600	Pro	Leu	Phe	Trp	Glu	Glu	Ile 605
75	Thr	Gly 610	Ala	Asp	Gly	Ile	Val 615	Arg	Gln	Leu	His	Trp 620	Thr	Ala	Arg	Val

ES 2 770 603 T3

	Glu	Gly	Ser	Phe	Glu	Thr	Pro	Asp	Gly	Tyr	Ala	Met	Thr	Met	Ser	Gln
	625					630					635					640
5	Tyr	Leu	Gly	Arg	Gly	Ala	Thr	Ser	Arg	Gly	Arg	Met	Thr	Leu	Ser	Pro
					645					650					655	
10	Thr	Leu	Asn	Thr	Val	Val	Ser	Asp	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Asp	Pro	Asn
				660					665					670		
15	Asp	Lys	Ala	Ala	Val	Val	Gln	Gly	Ile	Val	Asn	Leu	Gln	Lys	Ala	Leu
			675					680					685			
20	Ala	Asn	Val	Lys	Gly	Leu	Thr	Trp	Ala	Tyr	Pro	Ser	Ala	Asn	Gln	Thr
		690					695					700				
25	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Asp	Lys	Gln	Pro	Val	Thr	Tyr	Gln	Ser	Arg	Arg
	705					710					715					720
30	Ser	Asn	His	Trp	Met	Gly	Thr	Asn	Lys	Met	Gly	Thr	Asp	Asp	Gly	Arg
					725					730					735	
35	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	Val	Asp	Thr	Asn	Thr	Arg	Val	Tyr	Gly	Thr
				740					745					750		
40	Asp	Asn	Leu	Tyr	Val	Val	Asp	Ala	Ser	Ile	Phe	Pro	Gly	Val	Pro	Thr
			755					760					765			
45	Thr	Asn	Pro	Thr	Ala	Tyr	Ile	Val	Val	Ala	Ala	Glu	His	Ala	Ala	Ala
		770					775					780				
50	Lys	Ile	Leu	Ala	Gln	Pro	Ala	Asn	Glu	Ala	Val	Pro	Lys	Trp	Gly	Trp
	785					790					795					800
55	Cys	Gly	Gly	Pro	Thr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Gln	Thr	Cys	Gln	Ala	Pro	Tyr
					805					810					815	
60	Lys	Cys	Glu	Lys	Gln	Asn	Asp	Trp	Tyr	Trp	Gln	Cys	Val			
				820					825							
55	<210> 5															
	<211> 828															
	<212> PRT															
	<213> Myriococcum thermophilum															
60	<400> 5															
	Met	Arg	Thr	Ser	Ser	Arg	Leu	Ile	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu
	1				5					10					15	

ES 2 770 603 T3

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

ES 2 770 603 T3

	Gly	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Ile	Glu	Lys	Gly	Phe	Ala	Ser	Thr	Ala	Asn
			275					280					285			
5	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Gly	Pro	Glu	Trp	Leu	Glu	Gly	His	Asp	Leu	Thr
		290					295					300				
10	Arg	Phe	Asp	Val	Pro	Gly	Leu	Cys	Asn	Gln	Ile	Trp	Val	Asp	Ser	Lys
	305					310					315					320
15	Gly	Ile	Ala	Cys	Glu	Asp	Thr	Asp	Gln	Met	Ala	Gly	Cys	Val	Leu	Gly
					325					330					335	
20	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	Asn	Ala	Gly	Leu	Trp	Phe	Lys	Pro	Tyr	Ser	Leu
				340					345					350		
25	Asp	Trp	Asp	Tyr	Leu	Phe	Pro	Asp	Gly	Trp	Lys	Tyr	Asn	Asp	Val	Gln
			355					360					365			
30	Pro	Ala	Ile	Asn	Arg	Ala	Leu	Ser	Arg	Ile	Pro	Gly	Thr	Asp	Ala	Pro
		370					375					380				
35	Ser	Thr	Asp	Gly	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Gln	Glu	Gly	Phe	Glu	Val	Leu	Ser
	385					390					395					400
40	Lys	Gly	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Trp	Thr	Ser	Val	Thr	Ala	Asn	Asn	Ala
					405					410					415	
45	Pro	Asp	Lys	Lys	Asn	Arg	Thr	Phe	Ala	His	Ala	Pro	Phe	Met	Phe	Ala
				420					425					430		
50	Gly	Gly	Glu	Arg	Asn	Gly	Pro	Leu	Gly	Thr	Tyr	Phe	Gln	Thr	Ala	Lys
			435					440					445			
55	Lys	Arg	Asn	Asn	Phe	Asp	Val	Trp	Leu	Asn	Thr	Ser	Val	Lys	Arg	Val
		450					455					460				
60	Ile	Arg	Glu	Gly	Gly	His	Ile	Thr	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Pro	Phe	Arg
	465					470					475					480
65	Asp	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gly	Ile	Val	Pro	Val	Thr	Lys	Val	Thr	Gly	Arg
				485						490					495	
70	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Ile	Leu	Leu	Arg
			500						505					510		
75	Ser	Gly	Ile	Gly	Pro	Glu	Asp	Gln	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Glu
			515					520					525			

ES 2 770 603 T3

Lys Asp Gly Pro Thr Met Ile Gly Asn Ser Ser Trp Ile Asn Leu Pro
 530 535 540
 5 Val Gly Tyr Asn Leu Asp Asp His Leu Asn Thr Asp Thr Val Ile Ser
 545 550 555 560
 10 His Pro Asp Val Val Phe Tyr Asp Phe Tyr Glu Ala Trp Asp Asp Pro
 565 570 575
 15 Ile Glu Ser Asp Lys Asn Ser Tyr Leu Glu Ser Arg Thr Gly Ile Leu
 580 585 590
 20 Ala Gln Ala Ala Pro Asn Ile Gly Pro Met Phe Trp Glu Glu Ile Val
 595 600 605
 25 Gly Ala Asp Gly Ile Val Arg Gln Leu Gln Trp Thr Ala Arg Val Glu
 610 615 620
 30 Gly Ser Leu Gly Ala Pro Asn Gly His Thr Met Thr Met Ser Gln Tyr
 625 630 635 640
 35 Leu Gly Arg Gly Ala Thr Ser Arg Gly Arg Met Thr Ile Thr Pro Ser
 645 650 655
 40 Leu Thr Thr Ile Val Ser Asp Val Pro Tyr Leu Lys Asp Pro Asn Asp
 660 665 670
 45 Lys Glu Ala Val Ile Gln Gly Ile Ile Asn Leu Gln Asn Ala Leu Gln
 675 680 685
 50 Asn Val Ala Asn Leu Thr Trp Leu Phe Pro Asn Ser Thr Ile Thr Pro
 690 695 700
 55 Arg Glu Tyr Val Glu Ser Met Val Val Ser Pro Ser Asn Arg Arg Ser
 705 710 715 720
 60 Asn His Trp Met Gly Thr Asn Lys Leu Gly Thr Asp Asp Gly Arg Lys
 725 730 735
 65 Gly Gly Ser Ala Val Val Asp Leu Asp Thr Arg Val Tyr Gly Thr Asp
 740 745 750
 70 Asn Leu Phe Val Ile Asp Ala Ser Ile Phe Pro Gly Val Pro Thr Thr
 755 760 765
 75 Asn Pro Thr Ser Tyr Ile Val Val Ala Ala Glu His Ala Ser Ser Arg

ES 2 770 603 T3

	770		775			780										
5	Ile 785	Leu	Ala	Leu	Pro	Asp 790	Leu	Glu	Pro	Val	Pro 795	Lys	Tyr	Gly	Gln	Cys 800
10	Gly	Gly	Arg	Glu	Trp 805	Thr	Gly	Ser	Phe	Val 810	Cys	Ala	Asp	Gly	Ser 815	Thr
15	Cys	Glu	Tyr	Gln 820	Asn	Glu	Trp	Tyr	Ser 825	Gln	Cys	Leu				
20	<210> 6 <211> 829 <212> PRT <213> Stachybotrys bisbyi <400> 6															
25	Met 1	Leu	Phe	Lys	Leu 5	Ser	Asn	Trp	Leu	Leu 10	Ala	Leu	Ala	Leu	Phe	Val 15
30	Gly	Asn	Val	Val 20	Ala	Gln	Leu	Val	Gly 25	Pro	Thr	Pro	Tyr	Thr 30	Asp	Pro
35	Asp	Thr	Gly 35	Ile	Val	Phe	Gln	Ser 40	Trp	Val	Asn	Pro	Ala 45	Gly	Thr	Leu
40	Lys 50	Phe	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Ala 55	Asn	Ala	Ala	Thr 60	Val	Ala	Ala	Thr
45	Glu 65	Phe	Ile	Gly	Phe	Leu 70	Glu	Cys	Gln	Gly 75	Ala	Gly	Trp	Cys	Ser	Val 80
50	Ser	Leu	Gly	Gly	Ser 85	Met	Leu	Asn	Lys 90	Pro	Leu	Val	Val	Ala	Tyr 95	Pro
55	Ser	Gly	Asp	Glu 100	Val	Leu	Ala	Ser	Leu 105	Lys	Trp	Ala	Thr	Gly 110	Tyr	Ala
60	Asn	Pro	Glu 115	Pro	Tyr	Gly	Gly	Asn 120	His	Lys	Leu	Ser	Gln 125	Ile	Ser	Ser
65	Ser 130	Val	Thr	Ser	Ala	Gly	Phe	Arg 135	Val	Val	Tyr	Arg 140	Cys	Glu	Gly	Cys
70	Leu 145	Ala	Trp	Asn	Tyr	Gln 150	Gly	Ile	Glu	Gly	Gly 155	Ser	Pro	Thr	Asn	Gly 160
75	Ala	Ser	Met	Pro	Ile	Gly	Trp	Ala	Tyr	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Leu	Asn

ES 2 770 603 T3

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

ES 2 770 603 T3

	Pro	Ala	Gln	Lys	Asn	Arg	Thr	Tyr	Gly	Ala	Gly	Pro	Phe	Met	Phe	Ser
				420					425					430		
5	Gly	Gly	Glu	Arg	Gly	Gly	Pro	Leu	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala	Lys
			435					440					445			
10	Lys	Arg	Gly	Asn	Phe	Asp	Leu	Trp	Thr	Asn	Thr	Gln	Val	Lys	Arg	Val
		450					455					460				
15	Ile	Arg	Gln	Gly	Gly	His	Val	Thr	Gly	Val	Glu	Val	Glu	Asn	Tyr	Asn
	465					470					475					480
20	Gly	Asp	Gly	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Lys	Val	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Arg
					485					490					495	
25	Val	Val	Leu	Ser	Ala	Gly	Thr	Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Leu	Leu	Arg
				500					505					510		
30	Ser	Gly	Ile	Gly	Pro	Lys	Asp	Gln	Leu	Ala	Ile	Val	Lys	Asn	Ser	Thr
			515					520					525			
35	Asp	Gly	Pro	Thr	Met	Ala	Ser	Glu	Arg	Asp	Trp	Ile	Asn	Leu	Pro	Val
		530					535					540				
40	Gly	Tyr	Asn	Leu	Glu	Asp	His	Thr	Asn	Thr	Asp	Ile	Val	Ile	Ser	His
	545					550					555					560
45	Pro	Asp	Val	Val	His	Tyr	Asp	Phe	Tyr	Glu	Ala	Trp	Thr	Ala	Pro	Ile
					565					570					575	
50	Glu	Ser	Asp	Lys	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gly	Lys	Arg	Ser	Gly	Ile	Leu	Ala
				580					585					590		
55	Gln	Ala	Ala	Pro	Asn	Ile	Gly	Pro	Leu	Phe	Phe	Asp	Glu	Val	Arg	Gly
			595					600					605			
60	Ala	Asp	Asn	Ile	Val	Arg	Ser	Ile	Gln	Tyr	Thr	Ala	Arg	Val	Glu	Gly
		610					615					620				
65	Asn	Ser	Val	Val	Pro	Asn	Gly	Lys	Ala	Met	Val	Ile	Ser	Gln	Tyr	Leu
		625				630					635					640
70	Gly	Arg	Gly	Ala	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Met	Thr	Ile	Ser	Gln	Gly	Leu
				645						650					655	
75	Asn	Thr	Ile	Val	Ser	Thr	Ala	Pro	Tyr	Leu	Ser	Asn	Val	Asn	Asp	Leu
				660					665					670		

ES 2 770 603 T3

Glu Ala Val Ile Lys Ser Leu Glu Asn Ile Ala Asn Ser Leu Thr Ser
 675 680 685
 5 Lys Val Lys Asn Leu Lys Ile Glu Trp Pro Ala Ser Gly Thr Ser Ile
 690 695 700
 10 Arg Asp His Val Thr Asn Met Pro Leu Asp Pro Ala Thr Arg Arg Ala
 705 710 715 720
 15 Asn His Trp Ile Gly Thr Asn Lys Ile Gly Thr Lys Asp Gly Arg Leu
 725 730 735
 20 Thr Gly Gly Asp Ser Val Val Asp Leu Asn Thr Lys Val Tyr Gly Thr
 740 745 750
 25 Asp Asn Leu Phe Val Val Asp Ala Ser Ile Phe Pro Gly Met Val Thr
 755 760 765
 30 Thr Asn Pro Ser Ala Tyr Ile Val Ile Ala Ala Glu His Ala Ala Ser
 770 775 780
 35 Lys Ile Leu Ser Leu Pro Thr Ala Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Glu Gln
 785 790 795 800
 40 Cys Gly Gly Leu Glu Tyr Asn Gly Asn Phe Gln Cys Ala Ser Gly Leu
 805 810 815
 45 Thr Cys Thr Trp Leu Asn Asp Tyr Tyr Trp Gln Cys Thr
 820 825
 <210> 7
 <211> 771
 <212> PRT
 <213> Athelia rolfsii
 <400> 7
 50 Met Leu Ser Arg Leu Val Leu Asn Leu Leu Ala Ile Thr Val Ile Gly
 1 5 10 15
 55 Val Phe Gly Gln Ser Ser Ser Ser Tyr Thr Asp Asn Gly Ile Asn Phe
 20 25 30
 60 Gln Gly Ile Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Val Thr Tyr Gly Ala Val Phe
 35 40 45
 Pro Pro Ala Ser Val Asp Ser Asp Glu Phe Ile Gly Glu Ile Ala Ala
 50 55 60

ES 2 770 603 T3

	Pro	Val	Ala	Ala	Lys	Trp	Ile	Gly	Leu	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Met	Ile
	65					70					75					80
5	Asn	Asn	Leu	Leu	Ile	Val	Ala	Trp	Pro	Asn	Asn	Asn	Glu	Ile	Val	Phe
					85					90					95	
10	Ser	Ser	Arg	Tyr	Thr	Thr	Gly	Tyr	Val	Leu	Pro	Thr	Ile	Tyr	Ser	Gly
				100					105					110		
15	Pro	Lys	Ile	Thr	Thr	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Ser	Thr	His	Trp	Lys
			115						120				125			
20	Trp	Ile	Tyr	Arg	Cys	Gln	Asn	Cys	Thr	Thr	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Leu
		130					135					140				
25	Ala	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala	Val	Trp	Ala	Trp	Ala	Tyr	Ser	Ser	Ala	Ala
	145					150					155					160
30	Val	Asp	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro	Ser	Ser	Ser	Phe	Asp	Glu	His	Thr	Asp
					165					170					175	
35	Phe	Gly	Phe	Phe	Gly	Glu	Ile	Thr	Ser	Asn	Ala	His	Val	Ser	Gln	Ser
				180					185					190		
40	Val	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Leu	Thr	Gly	Thr	Gly	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser
			195					200					205			
45	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser
		210					215					220				
50	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ala	Thr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Val	Gly	Ala
	225					230				235						240
55	Gly	Pro	Ala	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Asp	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Gly	Lys
				245						250					255	
60	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Glu	Arg	Gly	Gly	Pro	Ser	Thr	Lys	Glu	Thr	Gly
			260						265					270		
65	Gly	Thr	Tyr	Thr	Ala	Pro	Trp	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Thr	Lys	Phe
			275				280						285			
70	Asp	Ile	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Asp	Ser	Asn	Ser	Phe
		290					295					300				
75	Trp	Trp	Cys	Lys	Asp	Ile	Thr	Val	Phe	Ala	Gly	Cys	Leu	Thr	Gly	Gly
	305					310					315					320

ES 2 770 603 T3

Gly Thr Ala Ile Asn Gly Ala Leu Tyr Trp Tyr Pro Thr Asp Leu Asp
 325 330 335
 5 Phe Ser Thr Ala Asn Gly Trp Pro Ser Ser Trp Thr Ala His Gln Lys
 340 345 350
 10 Tyr Thr Asp Leu Val Ser Ser Arg Leu Pro Ser Ser Asp His Pro Ser
 355 360 365
 15 Thr Asp Gly Lys Arg Tyr Leu Glu Gln Ser Ala Ala Val Val Ala Gln
 370 375 380
 20 Leu Leu Asn Gly Gln Gly Tyr Arg Asn Lys Thr Ile Asn Asn Ala Pro
 385 390 395 400
 25 Asn Ala Lys Asp His Val Tyr Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Phe Leu Asn
 405 410 415
 30 Gly Lys Arg Ala Gly Pro Val Ala Thr Tyr Leu Gln Thr Ala Lys Thr
 420 425 430
 35 Arg Asn Asn Phe His Phe Lys Asn Tyr Val Leu Val Ser Asn Val Val
 435 440 445
 40 Arg Asn Gly Ser Thr Ile Thr Gly Val Lys Thr Asn Asp Thr Ser Leu
 450 455 460
 45 Gly Pro Asn Gly Val Ile Pro Leu Thr Lys Asn Gly Arg Val Ile Leu
 465 470 475 480
 50 Ser Ala Gly Ser Leu Ser Ser Pro Arg Ile Leu Phe Gln Ser Gly Ile
 485 490 495
 55 Gly Pro Thr Asp Met Leu Thr Leu Val Gln Asn Asn Pro Thr Ala Ser
 500 505 510
 60 Ala Asn Leu Pro Ser Gln Ser Gln Trp Ile His Leu Pro Val Gly Tyr
 515 520 525
 65 Asn Val Ala Asp Ala Pro Ser Ile Asn Phe Val Phe Thr His Pro Ser
 530 535 540
 70 Ile Asp Ala Tyr Asp Asn Trp Ala Asn Val Trp Thr Asn Pro Arg Ser
 545 550 555 560
 75 Thr Asp Ala Glu Gln Tyr Leu Lys Asn Gln Ser Gly Val Leu Ala Ala

ES 2 770 603 T3

				565					570					575			
5	Ser	Ser	Pro	Lys 580	Leu	Asn	Phe	Trp	Arg	Ala	Tyr	Gly	Gly	Ser	Asp	Gly	
10	Arg	Thr	Arg	Trp	Met	Gln	Gly	Thr	Val	Arg	Pro	Gly	Ala	Ala	Ser	Ile	
15	Asn	Thr	Thr	Tyr	Asn	Tyr	Asn	Ala	Ser	Gln	Ile	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	
20	Tyr	Val	Ser	Thr	Gly	Ile	Thr	Ser	Arg	Gly	Arg	Ile	Gly	Val	Thr	Ser	
25	Ser	Leu	Asn	Val	Leu	Pro	Leu	Val	Asn	Pro	Trp	Leu	Val	Asp	Pro	Val	
30	Asp	Glu	Lys	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Leu	Glu	Asp	Leu	Val	Ser	Asn	Met	
35	Lys	Ser	Val	Pro	Gly	Leu	Thr	Met	Ile	Met	Pro	Asp	Asn	Thr	Thr	Ser	
40	Ile	Ala	Asp	Tyr	Val	Lys	Asn	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ser	Met	Asn	Ser	Asn	
45	His	Trp	Val	Gly	Ser	Asn	Lys	Ile	Ala	Ser	Asn	Ala	Thr	Glu	Gly	Val	
50	Val	Asp	Glu	His	Thr	Lys	Val	Phe	Arg	Thr	Asp	Asn	Leu	Phe	Ile	Val	
55	Asp	Ala	Ser	Ile	Ile	Pro	Ser	Leu	Pro	Met	Gly	Asn	Pro	Gln	Gly	Ala	
60	Leu	Met	Ser	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Val	Ala	Lys	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	
	Gly	Gly	Pro														

<210> 8
 <211> 774
 <212> PRT
 <213> Gelatoporia subvermispora

<400> 8

ES 2 770 603 T3

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

ES 2 770 603 T3

	Asn	Asn	Lys	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Glu	Arg	Gly	Gly	Pro	Ser	Thr	Gly
				260					265					270		
5	Glu	Thr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Val	Ala	Asp	Trp	Ala	Glu	Gly	Thr	Asn	Leu
			275					280					285			
10	Thr	Lys	Phe	Asp	Ile	Pro	Gly	Leu	Phe	Glu	Ser	Met	Phe	Asp	Asp	Pro
		290					295					300				
15	Asp	Pro	Trp	Tyr	Trp	Cys	Ser	Asp	Val	Thr	Phe	Tyr	Ala	Gly	Cys	Leu
	305					310					315					320
20	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Ser	Val	Asn	Gly	Ala	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Pro	Thr
					325					330					335	
25	Asp	Thr	Asp	Phe	Ser	Thr	Ala	Arg	Gly	Trp	Pro	Ser	Ser	Trp	Ser	Asn
			340						345					350		
30	His	Gln	Ala	Tyr	Thr	Asn	Ala	Met	Thr	Gln	Arg	Leu	Pro	Ser	Thr	Asp
			355					360					365			
35	His	Pro	Ser	Thr	Asp	Gly	Glu	Arg	Tyr	Leu	Glu	Gln	Ser	Ala	Gln	Val
		370					375					380				
40	Ala	Met	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Gln	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Ala	Thr	Ile	Asn
	385					390					395					400
45	Asp	Ser	Pro	Asp	Ser	Lys	Asp	His	Val	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Ala	Phe	Asp
					405					410					415	
50	Phe	Ile	Asn	Gly	Lys	Arg	Gly	Gly	Val	Val	Ala	Thr	Tyr	Leu	Gln	Thr
				420					425					430		
55	Ala	Asn	Gln	Arg	Ser	Asn	Phe	Val	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Thr	Leu	Val	Ser
			435					440					445			
60	Ser	Val	Val	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Gln	Thr	Asn	Asn
		450					455					460				
65	Thr	Ala	Ile	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Ile	Pro	Leu	Asn	Pro	Asn	Gly	Arg
	465					470					475					480
70	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	Gly	Ser	Phe	Gly	Thr	Pro	Arg	Ile	Leu	Phe	Gln
					485					490					495	
75	Ser	Gly	Ile	Gly	Pro	Thr	Asp	Met	Leu	Gln	Thr	Val	Gln	Gln	Asn	Ala
				500					505					510		

ES 2 770 603 T3

	Ala	Val	Ala	Ala	Asn	Met	Pro	Ser	Glu	Ser	Asp	Trp	Ile	Asn	Leu	Pro
			515					520					525			
5	Val	Gly	Met	Asn	Val	Ser	Asp	Asn	Pro	Ser	Ile	Asn	Leu	Val	Phe	Thr
		530					535					540				
10	His	Pro	Ser	Ile	Asp	Ala	Tyr	Asp	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Trp	Thr	Asp
	545					550					555					560
15	Pro	Arg	Pro	Ala	Asp	Ala	Ala	Gln	Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Ser	Gly	Val
					565					570					575	
20	Phe	Ala	Gly	Ala	Ser	Pro	Lys	Leu	Asn	Phe	Trp	Arg	Asp	Tyr	Glu	Gly
				580					585					590		
25	Ser	Asp	Gly	Ile	Gln	Arg	Ser	Ala	Gln	Gly	Thr	Val	Arg	Pro	Gly	Ala
			595					600					605			
30	Ala	Ser	Val	Asn	Thr	Thr	Leu	Pro	Tyr	Asn	Ala	Ser	Gln	Ile	Phe	Thr
		610					615					620				
35	Ile	Thr	Val	Tyr	Leu	Ser	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Arg	Gly	Arg	Ile	Gly
	625					630					635					640
40	Val	Thr	Ala	Gly	Leu	Asn	Ala	Val	Ala	Leu	Glu	Asn	Pro	Trp	Leu	Thr
					645						650				655	
45	Asp	Pro	Val	Asp	Lys	Val	Val	Leu	Ile	Gln	Ala	Leu	Glu	Asp	Val	Ile
				660					665					670		
50	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	Val	Pro	Asp	Leu	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Asp	Ser
			675					680					685			
55	Gly	Met	Thr	Leu	Glu	Glu	Tyr	Val	Asp	Leu	Tyr	Asp	Pro	Ser	Thr	Met
		690					695					700				
60	Cys	Ser	Asn	His	Trp	Val	Gly	Ser	Ala	Lys	Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp
	705					710					715					720
65	Thr	Ala	Val	Val	Asp	Glu	Asn	Ala	Lys	Val	Phe	Asn	Thr	Asp	Asn	Leu
					725					730					735	
70	Phe	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Ile	Val	Pro	Ser	Leu	Pro	Val	Gly	Asn	Pro
				740					745					750		
75	His	Gly	Thr	Val	Met	Ser	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Val	Ala	Asn	Ile	Leu
			755					760					765			

ES 2 770 603 T3

Ala Leu Ser Gly Gly Pro
770

<210> 9
5 <211> 773
<212> PRT
<213> Phanerochaete chrysosporium
<400> 9
10
Met Leu Gly Arg Ser Leu Leu Ala Leu Leu Pro Phe Val Gly Leu Ala
1 5 10 15
15 Phe Ser Gln Ser Ala Ser Gln Phe Thr Asp Pro Thr Thr Gly Phe Gln
20 25 30
20 Phe Thr Gly Ile Thr Asp Pro Val His Asp Val Thr Tyr Gly Phe Val
35 40 45
25 Phe Pro Pro Leu Ala Thr Ser Gly Ala Gln Ser Thr Glu Phe Ile Gly
50 55 60
30 Glu Val Val Ala Pro Ile Ala Ser Lys Trp Ile Gly Ile Ala Leu Gly
65 70 75 80
35 Gly Ala Met Asn Asn Asp Leu Leu Leu Val Ala Trp Ala Asn Gly Asn
85 90 95
40 Gln Ile Val Ser Ser Thr Arg Trp Ala Thr Gly Tyr Val Gln Pro Thr
100 105 110
45 Ala Tyr Thr Gly Thr Ala Thr Leu Thr Thr Leu Pro Glu Thr Thr Ile
115 120 125
50 Asn Ser Thr His Trp Lys Trp Val Phe Arg Cys Gln Gly Cys Thr Glu
130 135 140
55 Trp Asn Asn Gly Gly Gly Ile Asp Val Thr Ser Gln Gly Val Leu Ala
145 150 155 160
60 Trp Ala Phe Ser Asn Val Ala Val Asp Asp Pro Ser Asp Pro Gln Ser
165 170 175
Thr Phe Ser Glu His Thr Asp Phe Gly Phe Phe Gly Ile Asp Tyr Ser
180 185 190
65 Thr Ala His Ser Ala Asn Tyr Gln Asn Tyr Leu Asn Gly Asp Ser Gly
195 200 205

ES 2 770 603 T3

	Asn	Pro	Thr	Thr	Thr	Ser	Thr	Lys	Pro	Thr	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Val
		210					215					220				
5	Thr	Thr	Gly	Pro	Thr	Val	Ser	Ala	Thr	Pro	Tyr	Asp	Tyr	Ile	Ile	Val
	225					230					235					240
10	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Asp	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala
					245					250					255	
15	Gly	Lys	Lys	Val	Leu	Leu	Leu	Glu	Arg	Gly	Gly	Pro	Ser	Thr	Lys	Gln
			260						265					270		
20	Thr	Gly	Gly	Thr	Tyr	Val	Ala	Pro	Trp	Ala	Thr	Ser	Ser	Gly	Leu	Thr
			275					280					285			
25	Lys	Phe	Asp	Ile	Pro	Gly	Leu	Phe	Glu	Ser	Leu	Phe	Thr	Asp	Ser	Asn
		290					295					300				
30	Pro	Phe	Trp	Trp	Cys	Lys	Asp	Ile	Thr	Val	Phe	Ala	Gly	Cys	Leu	Val
	305					310					315					320
35	Gly	Gly	Gly	Thr	Ser	Val	Asn	Gly	Ala	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Pro	Asn	Asp
					325					330					335	
40	Gly	Asp	Phe	Ser	Ser	Ser	Val	Gly	Trp	Pro	Ser	Ser	Trp	Thr	Asn	His
			340						345					350		
45	Ala	Pro	Tyr	Thr	Ser	Lys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Pro	Ser	Thr	Asp	His
			355					360					365			
50	Pro	Ser	Thr	Asp	Gly	Gln	Arg	Tyr	Leu	Glu	Gln	Ser	Phe	Asn	Val	Val
		370					375					380				
55	Ser	Gln	Leu	Leu	Lys	Gly	Gln	Gly	Tyr	Asn	Gln	Ala	Thr	Ile	Asn	Asp
	385					390					395					400
60	Asn	Pro	Asn	Tyr	Lys	Asp	His	Val	Phe	Gly	Tyr	Ser	Ala	Phe	Asp	Phe
					405					410					415	
65	Leu	Asn	Gly	Lys	Arg	Ala	Gly	Pro	Val	Ala	Thr	Tyr	Leu	Gln	Thr	Ala
				420					425					430		
70	Leu	Ala	Arg	Pro	Asn	Phe	Thr	Phe	Lys	Thr	Asn	Val	Met	Val	Ser	Asn
			435					440					445			
75	Val	Val	Arg	Asn	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Gln	Thr	Asn	Asp	Pro

ES 2 770 603 T3

	450		455		460											
5	Thr 465	Leu	Gly	Pro	Asn	Gly 470	Phe	Ile	Pro	Val	Thr 475	Pro	Lys	Gly	Arg	Val 480
10	Ile	Leu	Ser	Ala	Gly 485	Ala	Phe	Gly	Thr	Ser 490	Arg	Ile	Leu	Phe	Gln 495	Ser
15	Gly	Ile	Gly	Pro 500	Thr	Asp	Met	Ile	Gln 505	Thr	Val	Gln	Ser	Asn 510	Pro	Thr
20	Ala	Ala	Ala 515	Ala	Leu	Pro	Pro	Gln 520	Asn	Gln	Trp	Ile	Asn 525	Leu	Pro	Val
25	Gly	Met 530	Asn	Ala	Gln	Asp	Asn 535	Pro	Ser	Ile	Asn	Leu 540	Val	Phe	Thr	His
30	Pro 545	Ser	Ile	Asp	Ala	Tyr 550	Glu	Asn	Trp	Ala	Asp 555	Val	Trp	Ser	Asn	Pro 560
35	Arg	Pro	Ala	Asp	Ala 565	Ala	Gln	Tyr	Leu	Ala 570	Asn	Gln	Ser	Gly	Val 575	Phe
40	Ala	Gly	Ala	Ser 580	Pro	Lys	Leu	Asn	Phe 585	Trp	Arg	Ala	Tyr	Ser 590	Gly	Ser
45	Asp	Gly	Phe 595	Thr	Arg	Tyr	Ala	Gln 600	Gly	Thr	Val	Arg	Pro 605	Gly	Ala	Ala
50	Ser	Val 610	Asn	Ser	Ser	Leu	Pro 615	Tyr	Asn	Ala	Ser	Gln 620	Ile	Phe	Thr	Ile
55	Thr 625	Val	Tyr	Leu	Ser	Thr 630	Gly	Ile	Gln	Ser	Arg 635	Gly	Arg	Ile	Gly	Ile 640
60	Asp 645	Ala	Ala	Leu	Arg 645	Gly	Thr	Val	Leu	Thr 650	Pro	Pro	Trp	Leu	Val 655	Asn
65	Pro 660	Val	Asp	Lys 660	Thr	Val	Leu	Leu	Gln 665	Ala	Leu	His	Asp	Val 670	Val	Ser
70	Asn 675	Ile	Gly	Ser	Ile	Pro	Gly	Leu	Thr 680	Met	Ile	Thr	Pro 685	Asp	Val	Thr
75	Gln 690	Thr	Leu	Glu	Glu	Tyr 695	Val	Asp	Ala	Tyr	Asp 700	Pro	Ala	Thr	Met	Asn

ES 2 770 603 T3

Ser Asn His Trp Val Ser Ser Thr Thr Ile Gly Ser Ser Pro Gln Ser
 705 710 715 720
 5 Ala Val Val Asp Ser Asn Val Lys Val Phe Gly Thr Asn Asn Leu Phe
 725 730 735
 10 Ile Val Asp Ala Gly Ile Ile Pro His Leu Pro Thr Gly Asn Pro Gln
 740 745 750
 15 Gly Thr Leu Met Ser Ala Ala Glu Gln Ala Ala Ala Lys Ile Leu Ala
 755 760 765
 20 Leu Ala Gly Gly Pro
 770
 <210> 10
 <211> 768
 <212> PRT
 25 <213> *Trametes versicolor*
 <400> 10
 30 Met Lys Phe Lys Ser Leu Leu Leu Ser Leu Leu Pro Leu Val Gly Ser
 1 5 10 15
 35 Val Tyr Ser Gln Val Ala Ala Pro Tyr Val Asp Ser Gly Asn Gly Phe
 20 25 30
 40 Val Phe Asp Gly Val Thr Asp Pro Val His Ser Val Thr Tyr Gly Ile
 35 40 45
 45 Val Leu Pro Gln Ala Ser Thr Ser Thr Glu Phe Ile Gly Glu Phe Val
 50 55 60
 50 Ala Pro Asn Glu Ala Gln Trp Ile Gly Leu Ala Leu Gly Gly Ala Met
 65 70 75 80
 55 Ile Gly Asn Leu Leu Leu Val Ala Trp Pro Asp Gly Asn Lys Ile Val
 85 90 95
 60 Ser Ser Pro Arg Tyr Ala Thr Gly Tyr Thr Leu Pro Ala Ala Tyr Ala
 100 105 110
 65 Gly Pro Thr Ile Thr Gln Leu Pro Ser Ser Ser Val Asn Ser Thr His
 115 120 125
 Trp Lys Phe Val Phe Arg Cys Gln Asn Cys Thr Ala Trp Asn Gly Gly
 130 135 140

ES 2 770 603 T3

	Ser	Ile	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr	Gly	Val	Phe	Ala	Trp	Ala	Phe	Ser	Asn
	145					150					155					160
5	Val	Ala	Val	Asp	Asp	Pro	Ser	Asp	Pro	Asn	Ser	Ser	Phe	Ala	Glu	His
					165					170					175	
10	Thr	Asp	Phe	Gly	Phe	Phe	Gly	Ile	Asn	Phe	Pro	Asp	Ala	Gln	Ser	Ser
				180					185					190		
15	Asn	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Leu	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr
			195					200					205			
20	Ser	Val	Pro	Ser	Gly	Pro	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Pro	Thr
		210					215						220			
25	Ala	Thr	Ala	Thr	Pro	Phe	Asp	Tyr	Ile	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Pro	Gly
	225					230					235					240
30	Gly	Leu	Val	Thr	Ala	Asp	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Gly	Lys	Lys	Val	Leu
					245					250					255	
35	Leu	Leu	Glu	Arg	Gly	Gly	Pro	Ser	Thr	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	Thr	Tyr
				260					265					270		
40	Asp	Ala	Thr	Trp	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Leu	Thr	Lys	Phe	Asp	Val	Pro
			275					280					285			
45	Gly	Leu	Phe	Glu	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Thr	Asn	Pro	Phe	Trp	Trp	Cys
		290					295					300				
50	Lys	Asp	Thr	Asn	Phe	Phe	Ala	Gly	Cys	Leu	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Ser
	305				310						315					320
55	Val	Asn	Gly	Ala	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Pro	Asn	Ser	Arg	Asp	Phe	Ser	Thr
					325					330					335	
60	Ala	Ser	Gly	Trp	Pro	Ser	Ser	Trp	Gly	Asn	His	Gln	Pro	Phe	Thr	Asp
				340					345					350		
65	Lys	Leu	Lys	Gln	Arg	Leu	Pro	Ser	Thr	Asp	His	Pro	Ser	Ala	Asp	Gly
			355					360					365			
70	Gln	Arg	Tyr	Leu	Glu	Gln	Ser	Ala	Thr	Val	Val	Gln	Gln	Leu	Leu	Ser
		370					375					380				
75	Gly	Gln	Gly	Tyr	Ser	Gln	Ile	Thr	Ile	Asn	Asp	Asn	Pro	Asp	Ser	Lys
	385					390					395					400

ES 2 770 603 T3

Asp His Val Phe Gly Phe Ser Ala Phe Asp Phe Leu Asn Gly Gln Arg
 405 410 415
 5 Ala Gly Pro Val Ala Thr Tyr Phe Glu Thr Ala Leu Ala Arg Lys Asn
 420 425 430
 10 Phe Val Tyr Lys Asp Asn Val Leu Val Thr Gln Val Ile Arg Asn Gly
 435 440 445
 15 Ser Thr Ile Leu Gly Val Arg Thr Asn Asp Asn Thr Leu Gly Pro Asp
 450 455 460
 20 Gly Ile Val Pro Leu Asn Pro Asn Gly Arg Val Ile Leu Ser Gly Gly
 465 470 475 480
 25 Ser Phe Gly Thr Pro Arg Ile Leu Phe Gln Ser Gly Ile Gly Pro Thr
 485 490 495
 30 Asp Met Leu Gln Thr Val Gln Ser Asn Ala Gln Ala Ala Ala Asn Leu
 500 505 510
 35 Pro Pro Gln Ser Glu Trp Ile Asn Leu Val Phe Thr His Pro Ser Ile Asp Ala
 515 520 525 530 540
 40 Tyr Asp Asn Trp Ala Asp Val Trp Ser Asn Pro Arg Pro Ala Asp Ala
 545 550 555 560
 45 Gln Gln Tyr Leu Gln Ser Arg Ser Gly Val Leu Ala Gly Ala Ser Pro
 565 570 575
 50 Lys Leu Asn Phe Trp Arg Ala Tyr Gly Gly Ser Asp Gly Ile Thr Arg
 580 585 590
 55 Tyr Ala Gln Gly Thr Val Arg Pro Gly Ala Ala Ser Val Asn Thr Ser
 595 600 605
 60 Val Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Ile Phe Thr Ile Thr Leu Tyr Leu Ser
 610 615 620
 65 Asn Gly Ile Gln Ser Arg Gly Arg Ile Gly Val Asp Ala Ala Leu Asn
 625 630 635 640
 Ala Lys Ala Leu Val Asn Pro Trp Leu Thr Asn Ser Val Asp Lys Thr
 645 650 655

ES 2 770 603 T3

	Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	His	Asp	Val	Thr	Ser	Thr	Met	Lys	Asn	Val
				660					665					670		
5	Pro	Gly	Leu	Thr	Met	Ile	Thr	Pro	Asp	Asn	Thr	Met	Thr	Leu	Glu	Gln
			675					680					685			
10	Tyr	Val	Ala	Ala	Tyr	Asp	Pro	Ala	Thr	Met	Cys	Ser	Asn	His	Trp	Val
		690					695					700				
15	Gly	Ala	Ala	Lys	Met	Gly	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Val	Asp	Glu
	705					710					715					720
20	Asn	Ala	Lys	Val	Phe	Asn	Thr	Asp	Asn	Leu	Phe	Ile	Val	Asp	Ala	Ser
					725					730					735	
25	Ile	Ile	Pro	Ser	Leu	Pro	Ile	Gly	Asn	Pro	Gln	Gly	Val	Leu	Met	Ser
				740					745					750		
30	Ala	Ala	Glu	Gln	Ala	Val	Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Pro
			755					760					765			
30	<210> 11															
	<211> 30															
	<212> ADN															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
35	<223> cebador															
	<400> 11															
	tatttcgaaa cgatgaggac cacctcggcc															
																30
40	<210> 12															
	<211> 29															
	<212> ADN															
	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
45	<223> cebador															
	<400> 12															
	tatcacgtgc tacacacact gccaatacc															
																29

REIVINDICACIONES

1. Una celobiosa deshidrogenasa (CDH) modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa que tiene una sustitución en el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 (CDH de *M. thermophilum*) por glutamina, isoleucina, treonina o leucina o una sustitución de asparagina en el motivo del centro activo que tiene la secuencia de aminoácidos NHW por glutamina, isoleucina, treonina o leucina, que comprende un dominio de flavodehidrogenasa modificada basado en uno de los dominios de flavodehidrogenasa no modificada de acuerdo con los aminoácidos 253-831 de la SEQ ID NO: 1, aminoácidos 269-845 de la SEQ ID NO: 2, aminoácidos 249-787 de la SEQ ID NO: 3, aminoácidos 253-829 de la SEQ ID NO: 4, aminoácidos 251-828 de la SEQ ID NO: 5, aminoácidos 251-829 de la SEQ ID NO: 6, aminoácidos 233-771 de la SEQ ID NO: 7, aminoácidos 236-774 de la SEQ ID NO: 8, aminoácidos 235-773 de la SEQ ID NO: 9, aminoácidos 230-768 de la SEQ ID NO: 10; dicho dominio de flavodehidrogenasa modificada tiene una secuencia con al menos un 50% de identidad de secuencia con uno de dichos dominios de flavodehidrogenasa no modificada y además comprende la mutación de sustitución en el aminoácido correspondiente al N721 de la SEQ ID NO: 5 o en el motivo NHW.
2. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el motivo del centro activo tiene la secuencia $X_1X_2NHWX_3X_4X_5$, en la que X_1 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de N, C y R; X_2 se selecciona de S y A; X_3 se selecciona de V, M e I; X_4 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de G y S; y X_5 es cualquier aminoácido, preferentemente seleccionado de S, A y T; especialmente preferido X_4 y X_5 no son ambos S.
3. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** la CDH es de *dikaryota*, preferentemente seleccionada de *ascomycota* o *basidiomycota*.
4. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada porque** la CDH es una CDH modificada de una CDH de *Myriococcum thermophilum*, *Corynascus thermophilus*, *Chaetomium atrobrunneum* (*Myceliophthora fergusii*), *Hypoxylon haematostroma*, *Neurospora crassa* o *Stachybotrys bisbyi*, *Athelia rolfsii*, *Gelatoporia subvermispora*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*.
5. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho dominio de flavodehidrogenasa modificada tiene una secuencia con al menos 70%, preferentemente al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, en particular se prefiere al menos 99%, de identidad de secuencia con uno de dichos dominios de flavodehidrogenasa no modificada, y además comprende la mutación de sustitución en el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 o en el motivo NHW.
6. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el aminoácido correspondiente a N721 de la SEQ ID NO: 5 o asparagina en el motivo NHW es el aminoácido N723 de la SEQ ID NO: 1, N738 de la SEQ ID NO: 2, N718 de la SEQ ID NO: 3, N722 de la SEQ ID NO: 4, N721 de la SEQ ID NO: 5, N721 de la SEQ ID NO: 6, N704 de la SEQ ID NO: 7, N707 de la SEQ ID NO: 8, N706 de la SEQ ID NO: 9, N701 de la SEQ ID NO: 10.
7. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se produce de forma recombinante por *Pichia pastoris*, se aísla por diafiltración, cromatografía de intercambio iónico y preferentemente se purifica adicionalmente por cromatografía de interacción hidrófoba.
8. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada porque** el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de lactosa es inferior a 10 mM, preferentemente según se determina con la CDH, o estando dicho dominio inmovilizado en un electrodo.
9. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada porque** el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de glucosa es superior a 3 M, preferentemente como se determina con la CDH, o estando dicho dominio inmovilizado en un electrodo.
10. La CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** el valor K_M de la celobiosa deshidrogenasa o su dominio funcional de flavodehidrogenasa para una reacción de oxidación de galactosa es superior a 3 M, preferentemente como se determina con la CDH, o estando dicho dominio inmovilizado en un electrodo.

11. Una molécula de ácido nucleico que codifica una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 5 12. Un procedimiento de producción de una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende expresar de forma recombinante una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 en una célula huésped.
- 10 13. Un electrodo que comprende una celobiosa deshidrogenasa inmovilizada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; preferentemente en el que la celobiosa deshidrogenasa se inmoviliza por adsorción, formación de complejo, con especial preferencia a través de un enlazador complejante adicional, enlace covalente o iónico, y/o en el que preferentemente la celobiosa deshidrogenasa inmovilizada se reticula, en particular por agentes bifuncionales, para aumentar la estabilidad o actividad.
- 15 14. Un procedimiento de detección de o cuantificación de lactosa en una muestra que comprende la etapa de oxidar la lactosa en dicha muestra con una CDH modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o un electrodo de acuerdo con la reivindicación 13 y detectar o cuantificar dicha oxidación, preferentemente en el que dicha muestra comprende o se sospecha que comprende glucosa y/o galactosa, con especial preferencia una muestra que contiene leche o productos lácteos.
- 20 15. Un kit de ensayo de lactosa que comprende la celobiosa deshidrogenasa modificada o su dominio funcional de flavodehidrogenasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o un electrodo de acuerdo con la reivindicación 13 y un medio de retención de muestras y/o estándares de lactosa.

ES 2 770 603 T3

Fig.1

A.rolfs: SEQ ID NO: 7; G.subve: SEQ ID NO: 8; P.chrys: SEQ ID NO: 9; T.versi: SEQ ID NO: 10;
 C.therm: SEQ ID NO: 3; S.bisby: SEQ ID NO: 6; N.crass: SEQ ID NO: 4; H.haema: SEQ ID NO: 2;
 C.atrob: SEQ ID NO: 1; M.therm: SEQ ID NO: 5;

	20	40	60	
A.rolfs	: YDYIIVGAGPAGIIAADRLSEAGKVVLLERGGPSTKETGGTYTAPWAASSGLTKFDIPGVFESLFTDSN	:	70	
G.subve	: YDYIIVGAGAGGIIAADRLSQNNKVVLLERGGPSTGETGGTYVADWAEGLNLTGKFDIPGLFESMFDPPD	:	70	
P.chrys	: YDYIIVGAGPGGIIAADRLSEAGKVVLLERGGPSTKQTTGGTYVAPWATSSGLTKFDIPGLFESLFTDSN	:	70	
T.versi	: FDYIIVGAGPGLVTADRLSEAGKVVLLERGGPSTAETGGTYDATWAKSANLTKFDVPLFETLFTDTN	:	70	
C.therm	: YDYIIVGAGAGGITVADKLESEAGKVVLLIEKGPSTGLWNGTMMKPEWLEGLDTRFDVPLGLCNQIWDVSA	:	70	
S.bisby	: YDYIIVGSGAGGIIPIADKLEAGKVVLLIEKGPSSGRYDGKLPKPTWLEGLNLTTRFDVPLGLCNQIWDVSA	:	70	
N.crass	: FDYIIVGGGAGGIPVADKLESESGKVVLLIEKGFSTGEHGGTLKPEWLNNTSLTRFDVPLGLCNQIWKDSD	:	70	
H.haema	: YDYIIVGAGAGGIIPLADKLESEAGKVVLLIEKGPSSGRWGGTLKPEWLKDTNLTTRFDVPLGLCNEIWNVA	:	70	
C.atrob	: FDYIIVGGGAGGIIPIADKLESEAGKVVLLIEKGIASTAEHGGTLGPEWLEGLDTRFDVPLGLCNQIWDVSK	:	70	
M.therm	: FDYIIVGGGAGGIIAADKLESEAGKVVLLIEKGFSTANTGGTLGPEWLEGLDTRFDVPLGLCNQIWDVSK	:	70	

	80	100	120	140	
A.rolfs	: SFWWCKDITVFAGCLTGGGTAINGALYWYPTDLDLFS--TANGWPSSWTAHQKYTDLVSSRLPSSDHPSTD	:	138		
G.subve	: PWWCSDVTFYAGCLLGGGTSVNGALYWYPTDLDLFS--TARGWPSSWSNHQAYTNAMTQRLPSTDHPSTD	:	138		
P.chrys	: PFWWCKDITVFAGCLVGGGTSVNGALYWYPTDLDLFS--SSVWGPSSWTNHAPYTSKLSRLPSTDHPSTD	:	138		
T.versi	: PFWWCKDITVFAGCLLGGGTSVNGALYWYPTDLDLFS--TASGWSSWGNHQPPTDKLQRLPSTDHPSTD	:	138		
C.therm	: GI-ACDQDQMGACVLLGGGTAVNAGLWKKPHPADWDDNFPHGWKSS--DLADATERVFSRIPTWHPSSQD	:	137		
S.bisby	: GI-ACRDTDQMGACVLLGGGTAVNAGLWKKPNPIDWDYDFPSSGWKSS--EMIGATNRVFSRIGGTTVPSQD	:	137		
N.crass	: GI-ACSDTDQMGACVLLGGGTAVNAGLWKKPYTKDWDYDFPSSGWKSS--DIAGATSRALSRIPTTTPSQD	:	137		
H.haema	: GV-ACDQDQMGACVLLGGGTAVNAGLWKKPYNLWDYDFPRGWKSS--DMAAATRRVFSRIPTDNPSSMD	:	137		
C.atrob	: GI-ACEDTDQMGACVLLGGGTAVNAGLWFKPYSLDWDYDFPSSGWKYS--DIQAALGRVFSRIPTDAPSTD	:	137		
M.therm	: GI-ACEDTDQMGACVLLGGGTAVNAGLWFKPYSLDWDYDFPDGWKYN--DVQPAINRALSRIPTDAPSTD	:	137		

	160	180	200	
A.rolfs	: GKRYLEQSAVAQQLLNGQGYRNKTINNAPNAKDHVYGYSAFDFLNGKRAGPVATYQLQAKTRNNFHFKN	:	208	
G.subve	: GERYLEQSAQVAMQLLNAQQGYQATINDSPDKDHDVYGYSAFDFLNGKRGGVVATYQLQANQRSNFVYKD	:	208	
P.chrys	: GQRYLEQSFNVVSQLKGGQYQATINDNPNYKDHVFGYSAFDFLNGKRAGPVATYQLQALARPNTFKT	:	208	
T.versi	: GQRYLEQSATVVQQLLGGQGYQATINDNPNYKDHVFGYSAFDFLNGKRAGPVATYQLQALARPNTFKT	:	208	
C.therm	: GKLYRQEGFEVVISQGLANAGWREVDANQEPSEKNRTYSHSVFMFSGGERGGPLATYLSAAQSRNFNLWV	:	207	
S.bisby	: GKTYRQEGFEVVISQGLANAGWREVDANQEPSEKNRTYSHSVFMFSGGERGGPLATYLSAAQSRNFNLWV	:	207	
N.crass	: GKRYLQGGFEVVISQGLANAGWREVDANQEPSEKNRTYSHSVFMFSGGERGGPLATYLSAAQSRNFNLWV	:	207	
H.haema	: GKRYLQGGFEVVISQGLANAGWREVDANQEPSEKNRTYSHSVFMFSGGERGGPMGTYLVSASRRKNPHLWT	:	207	
C.atrob	: GKRYRQEGFEVVISQGLANAGWREVDANQEPSEKNRTYSHSVFMFSGGERGGPLATYLSAAQSRNFNLWV	:	207	
M.therm	: GKRYRQEGFEVVISQGLANAGWREVDANQEPSEKNRTYSHSVFMFSGGERGGPLATYLSAAQSRNFNLWV	:	207	

	220	240	260	280	
A.rolfs	: YVLVSNVVRNGSTITGVKTNDT-SLGPNGVIPLTK-NGRVILSAGSLSSPRILFQSGIGPTDMLTLVQNN	:	276		
G.subve	: YTLVSNVVRNGSQILGVQNTNT-ATGPNGFIPLPN-NGRVILSAGSFGTTPRILFQSGIGPTDMLTLVQNN	:	276		
P.chrys	: NVMVSNVVRNGSQILGVQNTNDP-TLGPNGFIPVTP-KGRVILSAGAFGTSRILFQSGIGPTDMIQTQSN	:	276		
T.versi	: NVLVTQVIRNGSTILGVRTNDN-TLGPNGFIPVTP-KGRVILSAGSFGTTPRILFQSGIGPTDMLTLVQSN	:	276		
C.therm	: NTSVRRVIRGPRVSGVELECLADGGFNGTVNLKE-GGGVIFSAGAFGSAKLLRSRGIGPEDQLEIVAS-	:	275		
S.bisby	: NTQVRRVIRGQGHVTGVEVENYNGDGYKGTVKVTPVSGRVVLSAGTFGSAKLLRSRGIGPKDQLAIVKN-	:	276		
N.crass	: NTAVKRVIREGGHITGVEVEAFRNGGYSGIIPVNTTGRVVLSAGTFGSAKILLRSRGIGPKDQLEVVKA-	:	276		
H.haema	: GTAVKRVVIRGGHITGVEVEPFVNGGYTGVVNVTISITGRVVLSAGAFGSAKILLRSRGIGPEDQLEIVKS-	:	276		
C.atrob	: NTSVRRVIREGGHVTGVEVEPFRTGGYQIVNVTVAVSGRVVLSAGTFGSAKILLRGGIGPADQLEVVKAS	:	277		
M.therm	: NTSVRRVIREGGHITGVEVEPFRRDGGYEGIVPVTKVTRVILSAGTFGSAKILLRSRGIGPEDQLEVVAAAS	:	277		

	300	320	340	
A.rolfs	: PTASANLPSQSQWIHLVPGYNVADAPSINVFVTHPSIDAYDNWANVWVNPRSTDAEQYLKNGQSGVLAASS	:	346	
G.subve	: AAVAANMPSESDWINLPVGMNVSDNPSINLVFTHPSIDAYDNWADVVTDDPRPADAAQYLASQSGVLAGAS	:	346	
P.chrys	: PTAANLPPQNWQINLPVGMNAQDNPSINLVFTHPSIDAYENWADVWVSNPRPADAAQYLANQSGVLAGAS	:	346	
T.versi	: AQAANLPPQSEWINLPVGGQSVSDNPSINLVFTHPSIDAYDNWADVWVSNPRPADAAQYLSRSQVLAGAS	:	346	
C.therm	: SKDGETFISKNDWIKLPVGHNLIDHLNTDLIITHPDVVFYDFY-AAWNPITEDKEAYLNSRSGLIAQAA	:	344	
S.bisby	: STDGPTMASERDWINLPVGYNLEHDHTNTDIVISHPDVVHYDFY-EAWTAPIESDKTAYLGRSGILAQAA	:	345	
N.crass	: SADGPTMVSNSWIDLVPVGHNLVDHTNTDVIQHNNVTFYDFY-KAWDNPNTDMNLYLNGRSGIFAQAA	:	345	
H.haema	: STDGPTMISDSSWITLPVGYNLEHDHTNTDVTVTHPDVVFYDFY-EAGH-PNVTDKDLYLNSRAGILAQAA	:	344	
C.atrob	: KIDGPTMISNASWIPVGYNLDLHDHTNTDVTIHPDVAFYDFY-EAWNTPIEADKNSYLSRRTGILAQAA	:	346	
M.therm	: EKDGPTMIGNSSWILPVGYNLDLHDHTNTDVTIHPDVVFYDFY-EAWDDPIESDKNSYLSRRTGILAQAA	:	346	

ES 2 770 603 T3

Fig. 1 (continuación)

```

                360                380                400                420
A.rolfs : PKL--NFWRAYGGSDGRTRWMQGTVRPGAASINTTYNYNASQIFITITTYVSTGITSRGRIGVTSLSLNVLP : 414
G.subve : PKL--NFWRDYEGSDGIQRSAQGTVRPGAASVNTTLPYNASQIFITITVYLSSGITSRGRIGVTAGLNAVA : 414
P.chrys : PKL--NFWRAYSGSDGFTRYAQTGTVRPGAASVNSSLPYNASQIFITITVYLSTGTIQRGRIGIDAALRGTV : 414
T.versi : PKL--NFWRAYGGSDGITRYAQTGTVRPGAASVNTSVAYNASEIIFTITLYLSNGIQSRGRIGVDAALNAKA : 414
C.therm : PNIGPLMWEEVTPSDGITRQFQWTCRVEGDSSTK-----NSTHAMTLSQYLGRGVVSRGRMGITSGLTITV : 410
S.bisby : PNIGPLFFDEVRGADNIVRSIQYTARVEGNSVV-----PNGKAMVISQYLGRGAVSRGRMTISQGLNTIV : 410
N.crass : PNIGPLFWEEITGADGIVRQLHWTARVEGSFET-----PDGYAMTMSQYLGRGATSRGRMTLSPTLNTVV : 410
H.haema : PNIGPMFWEEIKGKDGVVRLQWTARVEGSAGT-----PNGYAMTMSQYLGRGAKSRGRMTITKALTTVV : 409
C.atrob : PNIGPMWEEIKGADGIVRQLQWTARVEGSFDT-----PNGQAMTISQYLGRGATSRGRMTITPSLTTVV : 411
M.therm : PNIGPMFWEEIVGADGIVRQLQWTARVEGSLGA-----PNGHTMTMSQYLGRGATSRGRMTITPSLTTIV : 411

                440                460                480+
A.rolfs : LVNPWLVDPVDEKVLTSLEDLVSNMK-SVPGLTMI MPDNTTSIADYVKNY--DRASMNSNHWVGSNKIA : 481
G.subve : LENPWLTDVPDKVLLIQALEDVISTLP-SVPDLTMITPDSGMTLEEYVDLY--DPSTMCSNHWVGSAMKG : 481
P.chrys : LTPPWLVNPDVKTLLQALHDVVSNTG-SIPGLTMITPDVDTQTLEEYVDAY--DPATMNSNHWVSTTIG : 481
T.versi : LVNPWLTNSVDKTVLLQALHDVTSMTK-NVPGLTMITPDNTMTLEQYVAAY--DPATMCSNHWVGAAMKG : 481
C.therm : AEHPYLHNDGDLEAVIQGIQNVVDALS-QVPDLEWVLPPTNTTVEEYVNSLIVSPANRRANHWMGTAKMG : 479
S.bisby : STAPYLSNVNDLEAVIKSLENIANSLSKVNKLEWPAAGTSIRDHVTNMPLDPATRRANHWIGTNKIG : 480
N.crass : SDLPYLKDPNDKAAVVQGI VNLQKALA-NVKGLTWAYPSANQTAADFVVKQPVTYQSRRSNHWMGTAKMG : 479
H.haema : STVPYLQDKNDVEAVIQGIKNLQAALS-NVKNLTWITYPPSNTTVEDFVNMLVSYTNRRSNHWIGTNKIG : 478
C.atrob : SDVPYLKDPNDKAEVIQGI VNLQNALK-NVAGLTWITYPNSITPREYVDNMVVS PNRANHWMGTAKIG : 480
M.therm : SDVPYLKDPNDKAEVIQGI INLQNALQ-NVANLTLWLPNSTITPREYVESMVVSPSNRRSNHWIGTNKIG : 480

                500                520                540                560
A.rolfs : SN-----ATEGVVDEHTKVFRTDNLFIVDASII PSLPMGNPQGALMSAAEQAVAKILALAGGP----- : 539
G.subve : TS-----SDTAVVDENAKVFNTDNLFVIDASIVPSLPVGNPHGTVMMSAAEQAVANILALSGGP----- : 539
P.chrys : SS-----PQS AVVDSNVKVFGTNNLFIVDAGIIPHLP TGNPQGTLMMSAAEQAAAKILALAGGP----- : 539
T.versi : TS-----SSTAVVDENAKVFNTDNLFIVDASII PSLPIGNPQGVLMMSAAEQAVSRILALAGGP----- : 539
C.therm : LDDGRS-GGS AVVDLNTKVYGT DNLFVVDASIFPGMSTGNPSAMIVIVAEQAAQRILSLRY----- : 539
S.bisby : TKDGRLTGGDSVVDLNTKVYGT DNLFVVDASIFPGMVTNPSAYIVIAAEHAAKILSLPTAKAAKYEQ : 550
N.crass : TDDGRS-GGTAVVD TNTRYGT DNLVVDASIFPGVPTTNPTAYIVVAAEHAAKILAQPANEA VPKWGW : 548
H.haema : TDDGRSRGGS AVVDLNTKVYGT DNLFVVDAGIFPGHITTNPTS YIVIAAERASERILDLPPARAQPRFAQ : 548
C.atrob : TDDGRLAGGS AVVDLNTKVYGT DNLFVVDASIFPGTPTTNPSAYIVTAAEHASQRILGLAAPKPVGKWGQ : 550
M.therm : TDDGRK-GGS AVVDLDRVYGT DNLFVIDASIFPGVPTTNPTS YIVVAAEHASSRILALPDLEVPVKYQ : 549

                580
A.rolfs : ----- : -
G.subve : ----- : -
P.chrys : ----- : -
T.versi : ----- : -
C.therm : ----- : -
S.bisby : CGGLEYNNGNFQCASGLTCTWLNDYYWQCT : 579
N.crass : CGGPTYTGSQTCQAPYKCEKQNDWYWQCV : 577
H.haema : CGGRWTGSEFQCAAPYTCQYRNERYSQCR : 577
C.atrob : CGGRQWTGSEFQCVSGTKCEVVNEWYSQCL : 579
M.therm : CGGREWTGSEFCADGSTCEYQNEWYSQCL : 578

```

Fig. 2

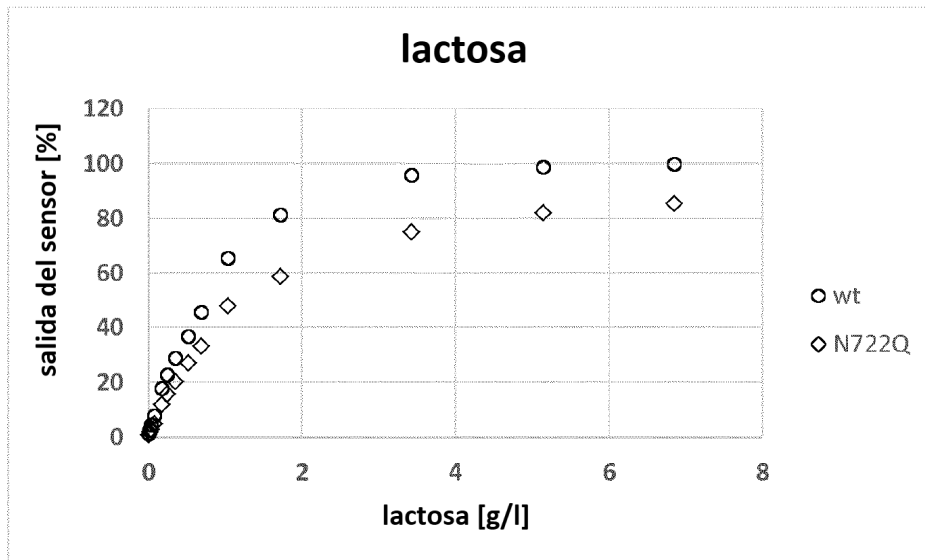


Fig. 3

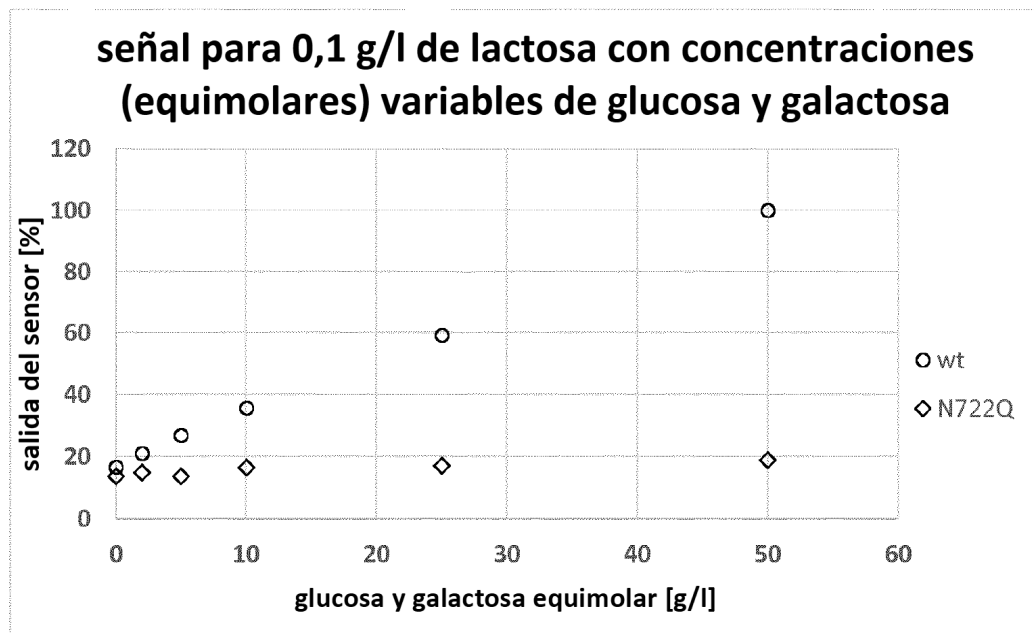


Fig. 4

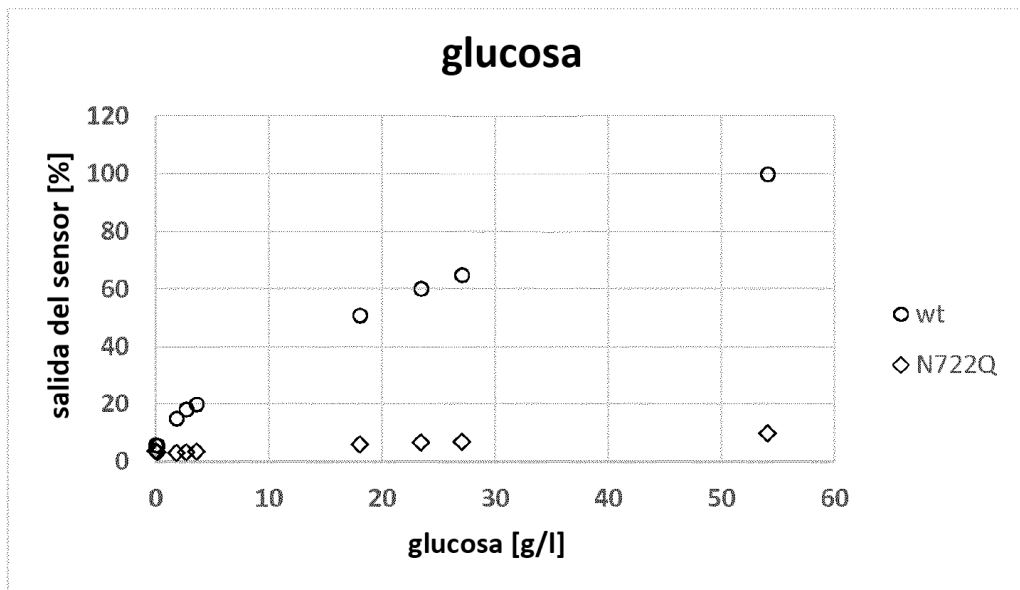


Fig. 5

