

CAMBIAR POR LA

TAPA.

PETITORIO



02 074872

SUPERINTENDENCIA
Radicación : 02074872 00000000 Folios: 119
Fecha (M/D): 2002-08-26 14:58:26
Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
O: Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I ☒ Capítulo II

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: DANISCO A/S

Dirección: Langebrogade 1

Nacionalidad o domicilio: Copenhague, Dinamarca

Lugar de Constitución: Dinamarca

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3 REPRESENTANTE APODERADO

Nombre: GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 7480 Fax: 28 8267

E-mail: info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 17'017.671 TP 2.978

4 INVENTOR(ES) (72)

Nombre: Ole Sibbesen y Jens Friisbaek Sorensen

Dirección: Vaersbrovej 117B y Nordevestpassagen 93

Nacionalidad o Domicilio: Bagsvaerd, Dinamarca y Aarhus, Dinamarca

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB01/00428 Fecha: Marzo 8, 2001

Publicación Internacional No. WO 01/66711 A1 Fecha: Septiembre 13, 2001

6 Título (54) ENZIMAS

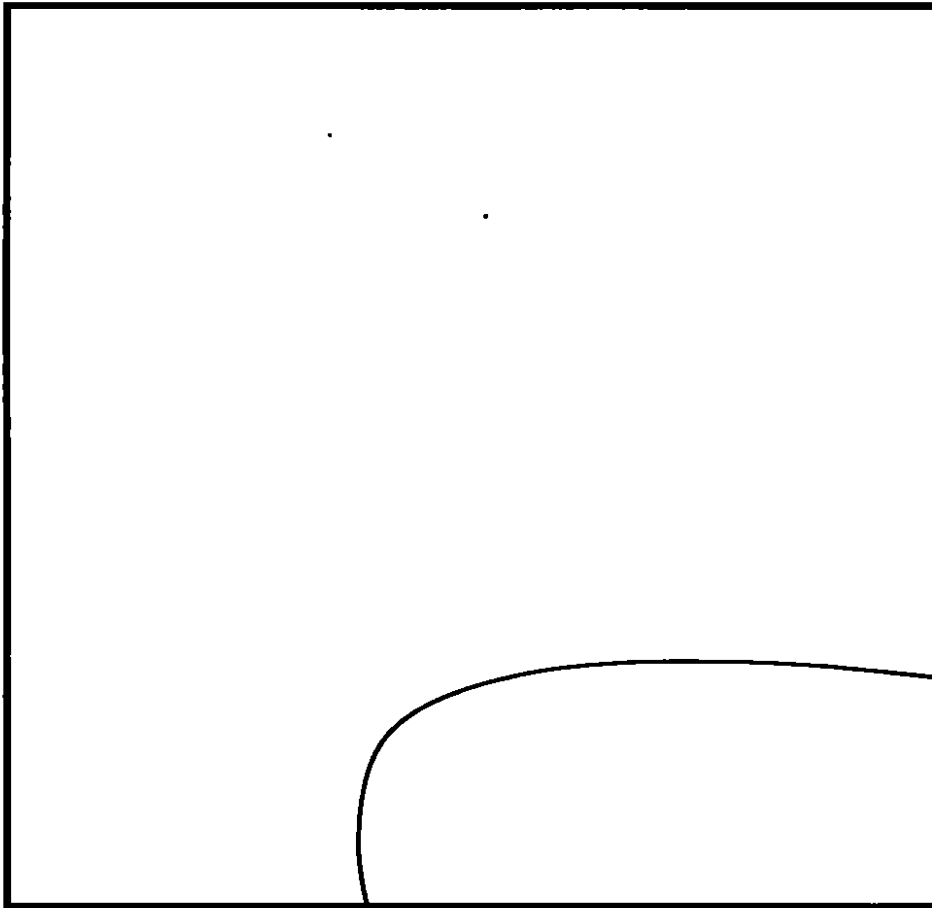
7 Clasificación Internacional (51) C12N 9/24

8 Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
Si ☒ No ☐	Gran Bretaña	Marzo 8, 2000	0005585.5
	Gran Bretaña	Junio 27, 2000	0015751.1

9 Comprobante de pago N°: 56292 y 56293 Fecha: _____

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso No. 15.802
- ☒ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERISTICA



12 Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAU

FIRMA: _____

C.C. 17017.871
de BogotáT.F No. 2878
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Superalimentos y Alimentos
 Radicación : 02074672 00000000 Folios: 119
 Fecha (MM): 2002-08-26 14:58:26
 Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 56,292
FECHA : AGOSTO 26 DE 2002

CONSIGNACION

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2981307	26/08/2002	675,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			378,000.00
		TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 000176089-2

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicacion : 02074872 00000000 Folios: 119
Fecha (H/M): 2002-08-26 14:56:26
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NNCI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 56,293
FECHA : AGOSTO 26 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	2981307	26/08/2002	675,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	90005-01-01	SOLICITUDES	
		02 INVOCACION DE UNA PRIORIDAD EN NU	106,000.00
		TOTAL :	9 106,000.00

SON: CIENTO SEIS MIL PESOS

RESPONSABLE : FDP

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

Campo de la Invención

La presente invención se refiere a enzimas de xilanasa mutante con sensibilidad alterada a los inhibidores de xilanasa. La presente invención también se refiere al uso de estas enzimas mutantes en el procesamiento de materiales vegetales.

Antecedentes de la invención

Durante muchos años, las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (denominadas en este contexto como xilanasas) se han usado para la modificación de carbohidratos complejos derivados de material de las paredes de las células de las plantas. En la técnica se conoce bien que la funcionalidad de diferentes xilanasas (derivadas de diferentes microorganismos o plantas) sí diferencia bastante.

Se han realizado estudios integrales que caracterizan la funcionalidad de la xilanasas en sustratos puros y bien caracterizados (Kormelin y colaboradores, 1992). Estos estudios demuestran que diferentes xilanasas tienen diferentes requerimientos específicos con respecto a la sustitución xilosa primaria de arabinoxilan (AX). Algunas xilanasas requieren tres residuos insustituídos de xilosa para hidrolizar la xilosa primaria; otros solo requieren uno o dos. Se cree que las razones por estas diferencias en especificidad se deben a la estructura de tres dimensiones dentro de los dominios catalíticos, que a la vez depende de la estructura primaria de la xilanasa, es decir, la secuencia de amino ácidos. Sin embargo, hasta ahora no se ha documentado el traslado de estas diferencias en las secuencias de amino ácidos en diferencias en la funcionalidad de las xilanasas cuando la xilanasa actúa en un ambiente complejo, tal como el material vegetal.

Tradicionalmente, los sustratos de xilanasa encontrados en trigo (harina de trigo) se han dividido en dos fracciones: el AX no extraíble en agua (WU-AX) y el AX extraíble en agua (WE-AX). La relación WU-AX:WE-AX es de aproximadamente 70:30 en la harina de trigo. Existen numerosas explicaciones de por qué hay dos fracciones diferentes de AX. La literatura anterior (D'Appolonia y MacArthur (1976) y Montgomery y Smith (1955)) describe altas diferencias en el grado de sustitución WE-AX y WU-AX. El grado más alto de sustitución se encontró en WE-AX. Esto se usó para explicar por qué algún AX era extraíble. El alto grado de sustitución hizo soluble el polímero en comparación con un grado de sustitución más bajo, lo que causaría el enlace de hidrógeno entre polímeros y en consecuencia, la precipitación.

Se ha pensado que la diferencia entre la funcionalidad de las diferentes xilanasas se debe a las diferencias en la especificidad de la xilanasas, y por ello, su preferencia por los sustratos WU-AX o WE-AX.

En algunas aplicaciones (por ej: panadería) se aconseja producir polímeros solubles de peso molecular alto (HMW) (*high molecular weight*) de la fracción WU-AX. Este tipo de polímeros ha sido correlacionado con un aumento en volumen en la elaboración del pan (Rouau, 1993; Rouau y colab. 1994 y Courtin y colab. 1999).

En otras aplicaciones se aconseja modificar el WU-AX HMW, haciendo el peso molecular más bajo, reduciendo su efecto hidrocoloide y de aquí, enlazando con agua en el producto (galletas, separación de harina, etc).

Estas aplicaciones diferentes requieren diferentes funcionalidades de las xilanasas usadas para que hagan el trabajo. Como ya se dijo, la diferencia en la funcionalidad ha sido explicada por las diferentes especificidades de sustrato de las xilanasas.

Resumen de la invención

En contraste con estudios anteriores, hemos demostrado ahora que otros factores son más importantes para determinar la funcionalidad de xilanasas que la especificidad del sustrato de las xilanasas determinadas en sustratos puros, bien caracterizados. La información que se presenta en este contexto demuestra que los inhibidores de xilanasas endógenas dictan la funcionalidad de las xilanasas que actualmente se usan por ejemplo, en sistemas de harina de trigo. Esto significa que una xilanasas que normalmente modifique el WU-AX, que da una mayor viscosidad líquida en la pasta en un sistema de harina de trigo, tiene una funcionalidad diferente si no hay un inhibidor de xilanasas endógena en la harina de trigo. Es por ello que nuestros hallazgos indican que el diseño y la aplicación de xilanasas no inhibidas, por ejemplo, mediante el uso de mutagenesis dirigida al sitio, podría ser una forma de simular la ausencia de los inhibidores de xilanasas en varios materiales vegetales, proporcionando de este modo a las nuevas xilanasas una funcionalidad completamente nueva. Este tipo de xilanasas sería muy efectivo en aplicaciones en las que se requiere una reducción en viscosidad. La xilanasas no inhibida actuaría con rapidez en el AX y estaría principalmente influenciada por su actividad específica y no por los inhibidores endógenos. De nuestros estudios, consideramos que es muy probable que los efectos inhibidores sean más importantes que la actividad específica. De hecho, nuestros resultados demuestran por primera vez, que hay entre 10 a 50 veces de diferencias en los niveles de inhibición entre las xilanasas de la familia J1.

Además, hemos procedido a diseñar y probar una serie de xilanasas modificadas por mutagenesis dirigida en sitio para demostrar que se pueden producir xilanasas con sensibilidad reducida a inhibidores de xilanasas presentes en materiales vegetales. En particular, hemos identificado un número de residuos en las xilanasas de la familia 11 que influyen el grado de inhibición de la xilanasas.

Por ello, será posible producir xilanasas variantes con sensibilidad reducida a los inhibidores de xilanasas y de aquí, con funcionalidad alterada. Esto, por ejemplo, permitirá una reducción en la cantidad de xilanasas requerida en un número de aplicaciones tales como alimento para animales, producción de almidón, panadería, separación de harinas (molienda en húmedo) y producción de papel y pulpa.

Por lo tanto, la presente invención ofrece un polipéptido de xilanasas variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasas, que comprende una o más modificaciones de amino ácidos de modo que el polipéptido o fragmento del mismo tenga una sensibilidad alterada a un inhibidor de xilanasas en comparación con la enzima precursora.

Aquí, la "enzima precursora" es la enzima de xilanasas de la cual se deriva o se puede derivar la enzima de xilanasas variante. Con respecto a la expresión "que se puede derivar", necesariamente no se requiere que la variante se derive de la enzima precursora. Por el contrario, la variante podría prepararse por ejemplo, mediante el uso de técnicas ADN recombinantes que usen secuencia(s) nucleótida(s) que codifiquen dicha secuencia de xilanasas variante - es decir, aquí, la(s) secuencia(s) nucleótida(s) es/son similares a la(s) secuencia(s) nucleótidas mutantes pero no son preparadas mediante mutación de la(s) secuencia(s) nucleótida(s) precursora(s). La variante aún puede prepararse mediante la modificación química de una enzima precursora.

Para algunas realizaciones, la enzima precursora es la enzima tipo silvestre. La expresión "tipo silvestre" es una expresión de la técnica que la entienden las personas versadas en la técnica e incluye un fenotipo característico de la mayoría de los miembros de una especie que ocurre naturalmente y que contrasta con el fenotipo de un mutante. Por ello, en el presente contexto, la enzima tipo silvestre puede ser una forma de la enzima que se encuentra naturalmente en la mayoría de los miembros de las respectivas especies. Por lo general, la enzima relevante tipo silvestre en relación con los polipéptidos variantes de la invención es la enzima tipo silvestre correspondientes que se relaciona más estrechamente en términos de homología de secuencia. Por ejemplo, para las xilanasas mutantes en particular que se describen en los ejemplos, la correspondiente enzima tipo silvestre es la

xilanasa *A. B. Subtilis* tipo silvestre, más específicamente la xilanasa *A. B. Subtilis* tipo silvestre publicada por Paice y colaboradores, 1986 y mostrada como la SEQ I.D.1. Sin embargo, cuando una secuencia tipo silvestre en particular se ha usado como la base para producir un polipéptido variante de la invención, ésta será la secuencia tipo silvestre correspondiente independientemente de la existencia de otro tipo de secuencia tipo silvestre que esté más estrechamente relacionada en términos de homología de secuencia de amino ácidos.

Para algunas realizaciones, preferiblemente el polipéptido variante se deriva de la xilanasa de la familia 11.

Uno de nuestros hallazgos asombrosos es que hasta ahora una mutación en el sitio activo de la xilanasa no tiene un efecto mensurable en la inhibición contra el inhibidor de xilanasa. Esto es en contraste directo con la(s) mutación(es) que se hace(n) fuera del sitio activo, las cuales trataremos más adelante.

En un aspecto preferido, la modificación de amino ácido es uno o más residuos de amino ácidos superficiales.

En un aspecto más preferido, la modificación de amino ácido es uno o más residuos accesibles solventes. De aquí, que el solvente sea agua.

En un aspecto más preferido, la modificación de amino ácido es uno o más residuos superficiales fuera del sitio activo.

En un aspecto altamente preferido, la modificación de amino ácido es uno o más residuos superficiales fuera del sitio activo y que es/son al menos accesibles a solvente en un 8%. De aquí que el solvente sea agua.

En un aspecto altamente preferido, la modificación de amino ácido es uno o más residuos superficiales fuera del sitio activo y que es/son al menos accesibles a solvente en un 10%. De aquí que el solvente sea agua.

La accesibilidad del solvente se puede determinar mediante el Swiss-PdbViewer (versión 3.5b1), el cual puede encontrarse en la página web: [http://www-expasy.ch/spdbv/mainpage.html](http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html). El Swiss-PdbViewer es presentado por la división de Investigaciones Experimentales de Glaxo Wellcome.

Los amino ácidos superficiales de las enzimas de xilanasa pueden ser determinados por una persona versada en la técnica.

A manera de ejemplo, la secuencia amino ácida *B. Subtilis* para la xilanasa A se muestra como SEQ I.D. No. 1. Con respecto a esta secuencia, los residuos amino ácidos superficiales son:

Ala1-Trp6, Asn8, Thr10-Gly23, Asn25, Ser27, Asn29, Ser31-Asn32, Gly34, Thr43-Thr44, Ser46-Thr50, Asn52, Asn54, Gly56-Asn61, Asn63, Arg73-Leu76, Thr87-Arg89, Thr91-Lys95, Thr97, Lys99, Asp101-Gly102, Thr104, Thr109-Thr111, Tyr113-Asn114, Asp119-Thr124, Thr126, Gln133-Asn141, Thr143, Thr145, Thr147-Asn148, Asn151, Lys154-Gly157, Asn159-Leu160, Ser162-Trp164, Gln175, Ser177, Ser179, Asn181, Thr183, Trp185.

Como ya se indicó, los aminoácidos superficiales de otras enzimas de xilanasa (tal como la xilanasa A *Thermomyces lanuginosus*, cuya secuencia nucleótida de codificación se muestra como SEQ ID No. 9), los puede determinar una persona versada en la técnica.

De aquí que, para algunos aspectos, la presente invención abarca un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, cuyo polipéptido de xilanasa variante o un fragmento de lo mismo, comprende una o más modificaciones de aminoácidos en cualquiera de los residuos: *superficiales ya como se las x persona técnica.*

Ala1-Trp6, Asn8, Thr10-Gly23, Asn25, Ser27, Asn29, Ser31-Asn32, Gly34, Thr43-Thr44, Ser46-Thr50, Asn52, Asn54, Gly56-Asn61, Asn63, Arg73-Leu76, Thr87-Arg89, Thr91-Lys95, Thr97, Lys99, Asp101-Gly102, Thr104, Thr109-Thr111, Tyr113-Asn114, Asp119-Thr124, Thr126, Gln133-Asn141, Thr143, Thr145, Thr147-Asn148, Asn151, Lys154-Gly157, Asn159-Leu160, Ser162-Trp164, Gln175, Ser177, Ser179, Asn181, Thr183, Trp185. *crates*

de la secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

Por ello, en una realización, la presente invención provee un polipéptido variante de xilanasa o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en cualquiera de los números de residuos de aminoácidos:

11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 175
As As As As

de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

En una realización, la presente invención ofrece un polipéptido de xilanasa variante o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, que comprende una o más

modificaciones de aminoácidos en cualquiera de los números de residuos de aminoácidos 11, 12 y 13 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos homólogos de xilanasa. 10⁹

Ejemplos preferidos específicos de modificaciones ya hechas se presentan en la sección de Ejemplos de este contexto.

Para algunas realizaciones, preferiblemente el polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, comprende una o más modificaciones de aminoácidos en cualquiera de los números de residuos de aminoácidos: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 61, 62, 63, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 173, 174, 175, 176, 177, 178 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos homólogos de xilanasa.

Para conveniencia, algunas veces nos referimos a los números de residuos de aminoácidos: 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 61, 62, 63, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 173, 174, 175, 176, 177, 178 como la BANDA 1.

La Figura 1 muestra la estructura 3-D de xilanasa *B. subtilis* que tiene la secuencia de aminoácido mostrada como la SEQ I.D. No. 1. La BANDA 1 se muestra en la Figura 1 como la capa superior de la molécula y se extiende aproximadamente 13 Ångstroms desde la parte superior de la molécula cuando la molécula está orientada tal como se muestra en la Figura 1. La BANDA 1 termina con el residuo Phe125 a lado izquierdo cuando se ve la Figura 1 y con el residuo Asn61 al lado derecho cuando se ve la Figura 1.

Además, o como alternativa, para algunas realizaciones, preferiblemente el polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, comprende una o más modificaciones de aminoácidos en cualquiera de los otros residuos de aminoácidos.

Preferiblemente, dichas modificaciones se pueden presentar en uno o más de los números de residuos de aminoácidos: 3, 4, 5, 6, 7, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 108, 109, 110, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 179, 180, 181, 182, 183 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

Para conveniencia, algunas veces nos referimos a los números de residuos de aminoácidos: 3, 4, 5, 6, 7, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 108, 109, 110, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 179, 180, 181, 182, 183 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* como la BANDA 2.

Preferiblemente, esas otras modificaciones se pueden presentar en uno o más de los números de residuos de aminoácidos superficiales: 3, 4, 5, 6, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 43, 44, 56, 57, 58, 59, 60, 72, 74, 75, 76, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 109, 110, 126, 159, 160, 162, 163, 164, 179, 181, 183 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

Preferiblemente, la presente invención abarca un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en la BANDA 1 y opcionalmente/o en la BANDA 2 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* o sus posiciones equivalentes (bandas) en otros polipéptidos de xilanasa homóloga. De aquí, que la modificación sea al menos en la BANDA 1; pero también se puede hacer solo en la BANDA 2.

El polipéptido de xilanasa variante puede comprender otras modificaciones en otros residuos de aminoácidos, tal como modificación en cualquiera de los residuos de aminoácidos: 1, 2, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 184, 185 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

El polipéptido de xilanasa variante puede comprender otras modificaciones en otros residuos de aminoácidos superficiales, tal como modificación en cualquiera de los residuos de aminoácidos superficiales: 1, 2, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 184, 185 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

Preferiblemente, el inhibidor es un inhibidor que se encuentra naturalmente en los tejidos vegetales. Preferiblemente, la sensibilidad de la enzima variante de xilanasa al inhibidor se reduce en comparación con la enzima precursora de xilanasa.

12

La presente invención también provee una molécula de ácido nucleico (una secuencia nucleotídica) que codifica un polipéptido de la invención. También se provee un vector que comprende un ácido nucleico de la invención, opcionalmente enlazado operacionalmente a una secuencia reguladora capaz de dirigir la expresión de dicho ácido nucleico en una célula anfitriona apropiada. Una célula anfitriona comprende un ácido nucleico o un vector de la invención.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para hacer un polipéptido de la invención que comprende transformar una célula anfitriona con un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, cultivar la célula transformada y expresar dicho polipéptido.

Nuestros resultados demuestran que estos polipéptidos variantes tienen propiedades mejoradas que les hace adecuados para una variedad de aplicaciones, tales como panadería, alimento para animales, producción de almidón, separación de harina (molienda en mojado) y producción de papel y pulpa.

Por lo tanto, la presente invención también provee el uso de un polipéptido variante de la invención en un método de modificar materiales vegetales.

También se provee el uso en horneado, de un polipéptido variante de la invención. La invención también provee el uso de un polipéptido variante de la invención en el procesamiento de cereales, producción de almidón y alimento para animales y el uso de un polipéptido variante de la invención en procesamiento de madera, por ejemplo, para mejorar el blanqueamiento de pulpa de madera.

En otro aspecto, la presente invención ofrece un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasa a un inhibidor, el cual (método) comprende modificar uno o más residuos aminoácidos de dicha enzima seleccionada de los números de aminoácidos 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 175 basado en la numeración de aminoácidos de la xilanasa *B. subtilis* que se muestra como la SEQ ID No. 1, o residuos equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga. Preferiblemente, se reduce la sensibilidad.

Un aspecto muy importante, es que nuestros resultados también demuestran por primera vez que los inhibidores de xilanasa juegan un papel importante en la determinación de la funcionalidad de enzimas de xilanasa en un sistema complejo, tal como un material vegetal. Por la expresión "funcionalidad", queremos decir las propiedades bioquímicas de la xilanasa en un sistema en particular. Estas propiedades incluyen especificidad del sustrato, parámetros cinéticos K_m y V_{max} (cuando sea el caso) y el nombre de los

productos de reacción obtenidos por la acción de la xilanasa en ese sistema. Por lo tanto, funcionalidad también puede describirse en términos del efecto en las propiedades físicas y/o químicas de los materiales vegetales en los que actúa la xilanasa, por ejemplo el grado al que se altera la viscosidad del material.

Del mismo modo que se pueden usar xilanasas variantes en una variedad de aplicaciones de procesamiento, los inhibidores de xilanasa pueden usarse en una variedad de aplicaciones de procesamiento tales como panadería, procesamiento de pulpa de madera y procesamiento de cereales.

Descripción detallada de la invención

Aunque en general, cualquiera de las técnicas moleculares que se mencionan en este contexto son conocidas en la técnica, se puede hacer referencia en particular a la publicación de Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989) y de Ausubel y colaboradores, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed John Wiley & Sons, Inc.

A. Polipéptidos de xilanasa variante

Se han reportado enzimas de xilanasa de casi 100 organismos diferentes, incluidos plantas, hongos y bacterias. Las enzimas de xilanasa se clasifican en varias de las más de 40 familias de enzimas glicosil hidrolasa. Las enzimas glicosil hidrolasa, que incluyen xilanasas, mannanasas, amilasas, β -glucanasas, celulasas y otras carbohidrasas, se clasifican con base en dichas propiedades como la secuencia de aminoácidos, la estructura de 3 dimensiones y la geometría del sitio catalítico (Gilkes y colaboradores, 1991, *Microbiol. Reviews* 55:303-315).

De particular interés para aplicaciones de panadería son las enzimas clasificadas en la Familia 11. Todas estas son xilanasas y se conocen como las "xilanasas de la Familia 11". Algunas publicaciones se refieren a éstas de un modo sinónimo como las xilanasas de la Familia G, pero en este contexto usaremos la expresión "xilanasas de la Familia 11" para referirnos tanto a las xilanasas de la Familia G como de la Familia 11.

La Tabla A hace una lista de un número de xilanasas conocidas de la Familia 11. La mayoría de ellas tienen una masa molecular de aproximadamente, 21,000 Da. Tres de las xilanasas de la Familia 11 (*Clostridium stercorarium* XynA, *Streptomyces lividans* XynB y *Thermomonospora fusca* XynA) tienen una masa molecular más alta entre 31,000 y 50,000 Da. Sin embargo, estas xilanasas tienen una secuencia de núcleo catalítica de aproximadamente 21,000 Da similar a las otras xilanasas de la Familia 11. Las secuencias

73
14

de aminoácidos de las xilanasas de la Familia 11 (o para las enzimas más grandes, el núcleo catalítico) demuestran un alto grado de similitud, normalmente con mas del 40% de aminoácidos idénticos en una alineación adecuada de aminoácidos. Las xilanasas de la Familia 11, que son de origen bacteriano, levadura o fungal, comparten la misma estructura molecular general.

La Figura 2 muestra los datos de la alineación de la secuencia de aminoácidos con respecto a 51 xilanasas de la Familia 11.

TABLA A – Xilanasas de la Familia 11.

<i>Aspergillus niger</i> Xyn A	<i>Aspergillus kawachii</i> Xyn C
<i>Aspergillus tubigensis</i> Xyn A	<i>Bacillus circulans</i> Xyn A
<i>Bacillus pumilus</i> Xyn A	<i>Bacillus subtilis</i> Xyn A
<i>Cellulomonas fimi</i> Xyn D	<i>Chainia</i> spp. Xyn
<i>Clostridium acetobutlicum</i> Xyn B	<i>Clostridium stercorarium</i> Xyn A
<i>Fibrobacter succionogenes</i> Xyn C	<i>Neocallimastix patriciarum</i> Xyn A
<i>Nocardopsis dassonvillei</i> Xyn II	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> Xyn A
<i>Schizophyllum commune</i> Xyn	<i>Streptomyces lividan</i> Xyn B
<i>Streptomyces lividan</i> Xyn C	<i>Streptomyces</i> sp. No. 36a Xyn
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> Xyn II	<i>Thermonospora fusca</i> Xyn A
<i>Trichoderma harzianum</i> Xyn	<i>Trichoderma reesei</i> Xyn I
<i>Tricoderma reesei</i> Xyn II	<i>Trichoderma viride</i> Xyn

Xilanasas variantes de la invención

Típicamente, un polipéptido de xilanasa variante de la invención se obtiene modificando un polipéptido de xilanasa mediante la sustitución, eliminación o adición de uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de xilanasas. Preferiblemente, la modificación comprende una o más sustituciones de aminoácidos. La modificación de las secuencias de polipéptidos se puede hacer mediante el uso de técnicas estándar tales como mutagenesis dirigida en el sitio. La modificación también puede ocurrir mediante técnicas químicas, tales como la modificación química de uno o más residuos de aminoácidos.

La secuencia de inicio puede ser una secuencia tipo silvestre o una secuencia que ocurra no naturalmente, por ejemplo, un derivado que ya haya estado sujeto a ingeniería de proteína. La secuencia de xilanasa que se vaya a modificar puede ser de cualquier origen, por ejemplo, bacteriano, fungal o vegetal. Preferiblemente, la secuencia de xilanasa que vaya a ser modificada es la de una xilanasa de la Familia II, más preferiblemente una xilanasa de la Familia II seleccionada de la xilanasa I, la xilanasa II *Trichoderma reesei*, la xilanasa *Trichoderma harzianum*, la xilanasa *Trichoderma viride*, la xilanasa A *Bacillus circulans*, la xilanasa A *Bacillus subtilis*, la xilanasa *Aspergillus niger*, la xilanasa C *Aspergillus kawachii*, la xilanasa A *Aspergillus tubigensis*, la xilanasa B *Streptomyces lividans*, y la xilanasa C *Streptomyces lividans*.

En una realización especialmente preferida, la secuencia de xilanasa que vaya a ser modificada es la secuencia de la xilanasa *B. subtilis* que se muestra como la SEQ ID No. 1 o una homóloga de la misma. Preferiblemente, dicha homóloga tiene una homología de al menos 40, 50, 60 u 80% sobre al menos 50 ó 100 residuos de aminoácidos según se determina usando el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, U.S.A.; Devereux y colaboradores, 1984, *Nucleic Acids Research* 12:387).

Las modificaciones específicas que se prefieren según la presente invención incluyen una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 175 basadas en la numeración de aminoácidos de la xilanasa *B. subtilis* que se muestra como la SEQ ID No. 1 o los residuos equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

En particular, las sustituciones preferidas incluyen uno o más de D11sY, D11sN, D11sF, D11sK, D11sS, D11sW, G12sF, G13sF, I15sK, N17sK, N17sY, N17sD, N20sK, N20sY, N29sD, S31sK, S31sY, S31sD, N32sK, G34sD, G34sF, G34sT, Y113sA, Y113sD, Y113sK, N114sA, N114sD, N114sF, N114sK, D119sK, D119sY, D119sN, G120sK, G120sD, G120sF, G120sY, G120sN, D121sN, D121sK, D121sF, D121sA, R122sD, R122sF, R122sA, T123sK, T123sY, T123sD, T124sK, T124sY, T124sD, Q175sE, Q175sS y Q175sL (con referencia a la secuencia de aminoácidos de la xilanasa *B. subtilis*) o sus equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga. Otras referencias a residuos específicos de la xilanasa *B. subtilis* que se muestra como la SEQ ID No. 1 también incluyen sus equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

Se puede hacer una combinación de mutaciones, por ejemplo mutaciones en dos o más de los residuos arriba mencionados. En la sección de Ejemplos se presentan ejemplos de este tipo de combinaciones.

En otra realización, los polipéptidos variantes de la invención pueden ser xilanasas mutantes purificadas y aisladas que ocurren de manera natural. Alternativamente, se pueden generar xilanasas mutantes sometiendo los organismos a mutágenos y seleccionando luego individuos que comprendan mutaciones en sus genes de xilanasas. Se pueden identificar/seleccionar mutantes que ocurren de manera natural y mutantes generados por mutagenesis aleatoria mediante el uso de una variedad de técnicas tales como selección PCR usando cebadores adecuados de ácido nucleico para amplificar regiones de genes de xilanasas y secuenciar los fragmentos que resulten.

De este modo, los polipéptidos variantes de la invención incluyen xilanasas mutantes que ocurren de manera natural (purificadas y aisladas de los organismos donde ocurren o se obtienen de manera recombinante), xilanasas mutantes obtenidas por mutagenesis aleatoria y xilanasas mutantes obtenidas por mutagenesis dirigida en el sitio.

Los polipéptidos variantes de la invención también se pueden someter a otras modificaciones que no necesariamente afectan la sensibilidad a los inhibidores, incluida cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, eliminación o adición de un (o más) aminoácidos de o a la secuencia, siempre y cuando la secuencia de aminoácido resultante retenga la actividad de xilanasas, preferiblemente, que tenga al menos sustancialmente la misma actividad de xilanasas que la secuencia no modificada.

Se pueden hacer sustituciones conservadoras, por ejemplo según la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre sí:

ALIFATICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - no cargados	C S T M
		N Q
	Polares - cargados	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Los polipéptidos de la invención también incluyen fragmentos de las secuencias de longitud completa arriba mencionadas que tengan actividad de xilanasas.

Los polipéptidos de la invención también pueden comprender secuencias heterólogas de aminoácidos, típicamente en el N-terminus o en el C-terminus, preferiblemente en el N-terminus. La secuencia heteróloga puede incluir secuencias que afecten la identificación de proteínas intra o extracelulares (tales como secuencias líderes).

Típicamente, los polipéptidos de la invención se hacen por medios recombinantes, por ejemplo, tal como se describe a continuación. Sin embargo, también pueden hacerse por medios sintéticos mediante técnicas conocidas para las personas versadas en la técnica, tal como síntesis de fase sólida. Los polipéptidos de la invención también pueden producirse como proteínas de fusión, por ejemplo como ayuda en la extracción y la purificación. También puede ser conveniente incluir un lugar de escisión proteolítica entre el socio de la proteína de fusión y la secuencia proteínica de interés para permitir la remoción de las secuencias de las proteínas de fusión, tal como un lugar de escisión de trombina. Preferiblemente, la proteína de fusión no impide la función de la secuencia proteínica de interés.

Se espera que el uso adecuado de las células anfitrionas provea las modificaciones postrasmacionales que se requieran con el fin de conferir una actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la invención.

Los polipéptidos de la invención pueden ser en forma sustancialmente aislada. Se entiende que la proteína puede combinarse con vehículos o diluyentes que no interfieran con el propósito de la proteína y que sigan siendo considerados como sustancialmente aislados. Un polipéptido de la invención también puede ser en forma sustancialmente purificada, en cuyo caso, por lo general comprenderá la proteína en una preparación en la cual más del 90%, por ej: 95%, 98% o 99% de la proteína en la preparación es un polipéptido de la invención.

Los polipéptidos variantes de la invención tienen sensibilidad alterada a los inhibidores de xilanasa en comparación con la secuencia de la xilanasa precursora, la cual puede ser una xilanasa correspondiente tipo silvestre. Preferiblemente, los polipéptidos variantes tienen sensibilidad reducida a los inhibidores de xilanasa. La expresión "sensibilidad alterada a inhibidores de xilanasa" significa el grado al que la actividad endo- β -1,4-xilanasa de un polipéptido variante de la invención es inhibida por el inhibidor de xilanasa es diferente del de la enzima de xilanasa precursora, la cual puede ser la correspondiente xilanasa tipo silvestre. Preferiblemente, el grado al cual el polipéptido variante es inhibido por el inhibidor es inferior que el de la enzima de la xilanasa precursora, la cual puede ser la proteína tipo silvestre. Esto puede deberse, por ejemplo, a un cambio en la estructura de tres dimensiones del polipéptido variante, de modo que el inhibidor no se enlace más con la misma afinidad que hace a la enzima de la xilanasa precursora, la cual puede ser la enzima tipo silvestre.

La sensibilidad de los polipéptidos variantes de la invención a inhibidores de xilanasa se pueden ensayar usando, por ejemplo, el ensayo en el Ejemplo 4 y a continuación. Un inhibidor adecuado para uso en el ensayo es el inhibidor purificado de harina de trigo del Ejemplo 1. Otros inhibidores se describen a continuación.

Ensayo de xilanasa (actividad de Endo- β -1,4-Xilanasa)

Se diluyen muestras de xilanasa en ácido cítrico (0,1 M), tamponador *-di*-fosfato de hidrógeno sódico (0,2 M) pH 5,0, para obtener aproximadamente OD=0,7 en el ensayo final. Se someten a termostato durante 5 minutos a 40°C tres diluciones de la muestra y un estándar interno con una actividad definida. En tiempo = 5 minutos, se agrega 1 marcador de Xilazima (substrato de xilana tinturada, de enlace cruzado). En tiempo = 15 minutos (o en algunos casos durante más tiempo dependiendo de la actividad de xilanasa presente en la muestra) la reacción se termina agregando 10 ml de TRIS al 2%. La mezcla de la reacción es centrifugada y se mide el OD del sobrenadante a 590 nm. Teniendo en cuenta las diluciones y la cantidad de xilanasa, se puede calcular la actividad (TXU, Total Unidades de Xilanasa) con respecto al estándar.

Inhibidores de xilanasa

Tal como se usa en este contexto, la expresión "inhibidor de xilanasa" se refiere a un compuesto, típicamente una proteína, cuya función es controlar la despolimerización de carbohidratos complejos, como arabinoxilano, que se encuentran en las paredes de la células vegetales. Estos inhibidores de xilanasa pueden reducir la actividad de enzimas de xilanasa que ocurren de manera natural, así como las de origen fungal o bacteriano. Aunque se ha reportado la presencia de inhibidores de xilanasa en semillas de cereales (ver por ejemplo; McLauchlan y colaboradores 1999a; Rouau y Saget 1998), no se ha examinado ampliamente su impacto en la eficacia de las enzimas de xilanasa.

McLauchlan y colaboradores (1999a) divulgan el aislamiento y la caracterización de una proteína de trigo que se enlaza a e inhibe dos xilanasas de la familia 11. Igualmente, la Patente WO 98/49278 demuestra el efecto de un extracto de harina de trigo en la actividad de un grupo de xilanasas microbianas, clasificadas como xilanasas de la familia 11. Debyser y colaboradores (1999) también divulgan que las endoxilanasas de *Aspergillus Niger* y *Bacillus subtilis*, ambas xilanasas de la familia 11, fueron inhibidas por un inhibidor de xilanasa de trigo denominado TAXI. McLauchlan y colaboradores (1999b) enseñan que extractos de harinas comerciales tales como trigo, cebada, centeno y maíz pueden inhibir las xilanasas de las familias 10 y 11.

El inhibidor de xilanasa puede ser cualquier inhibidor de xilanasa adecuado. A modo de ejemplo, el inhibidor de xilanasa puede ser el inhibidor que describe la Patente WO-A 98/49278 y/o el inhibidor de xilanasa que describe Rouau, X y Surget, A (1998), McLauchlan y colaboradores (1999) y/o el inhibidor de xilanasa que describen la solicitud de patente del Reino Unido No. 9828599.2 (radicada el 23 de diciembre de 1998), la solicitud de patente del Reino Unido No. 9907805.7 (radicada el 6 de abril de 1999) y la solicitud de patente del Reino Unido No. 9908645.6 (radicada el 15 de abril de 1999).

Ensayo del inhibidor de xilanasa

Se mezclan 100 μ l de una fracción del inhibidor candidato, 250 μ l de solución de xilanasa (conteniendo 12 TXU de xilanasa microbiana/ml) y 650 μ l de tamponador (0,1 M ácido cítrico - 0,2M *di*-fosfato de hidrógeno sódico, pH 5,0). Se somete la mezcla a termostato durante 5 minutos a 40,0°C. En tiempo = 5 minutos, se agrega un marcador de Xilazima. En tiempo = 15 minutos se termina la reacción agregando 10 ml de TRIS al 2%. La mezcla de la reacción es centrifugada (3500g. 10 minutos a temperatura ambiente) y el sobrenadante se mide a 590 nm. La inhibición es calculada como la actividad residual en comparación con el blanco. El blanco se prepara de la misma manera, salvo que los 100 μ l del inhibidor se sustituyen por 100 μ l de tamponador (0,1 M ácido cítrico - 0,2 M *di*-fosfato de hidrógeno sódico, pH 5,0).

Inhibidor específico de xilanasa S

Como ya se indicó, un inhibidor de xilanasa que se puede usar de acuerdo con la presente invención es el inhibidor de xilanasa que describen la solicitud de patente del Reino Unido No. 9828599.2 (radicada el 23 de diciembre de 1998), la solicitud de patente del Reino Unido No. 9907805.7 (radicada el 6 de abril de 1999) y la solicitud de patente del Reino Unido No. 9908645.6 (radicada el 15 de abril de 1999).

Este inhibidor endógeno endo- β -1,4-xilanasa se obtiene de la harina de trigo. El inhibidor es un di-péptido que tiene un MW de aproximadamente 40 kDa (según medición por SDS-PAGE o espectrometría de volumen) y un pI aproximadamente entre 4,8 y 9,5.

El análisis de la secuencia hasta la fecha ha revelado que el inhibidor tiene al menos una o más de las secuencias presentadas como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, y/o SEQ ID No. 8.

Estos inhibidores que se describen en la técnica anterior también pueden usarse en ensayos para determinar la sensibilidad de un polipéptido variante de la invención a inhibidores de

xilanasa. También pueden usarse como se describe a continuación, para modular la funcionalidad de una xilanasa.

19
20

Polinucleótidos

Los polinucleótidos de la invención comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias del polipéptido variante de la invención. Una persona versada en la técnica entenderá que se varios polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, se entiende que las personas versadas en la técnica pueden, mediante técnicas rutinarias, hacer sustituciones nucleótidas que no afecten la secuencia de polipéptidos codificada por los polinucleótidos de la invención que reflejen el uso codón de un organismo anfitrión en particular en el cual se vayan a expresar los polipéptidos de la invención.

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. Puede ser de una sola hebra o de hebra doble. También pueden ser polinucleótidos que incluyan dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conoce un número de tipos diferentes de modificación a oligonucleótidos. Estos incluyen metilfosfonato fosforotioato primarios, además de cadenas de acridina o polilisina en las terminales 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se debe entender que los polinucleótidos que se describen en este contexto pueden ser modificados por cualquier método disponible en la técnica. Estas modificaciones pueden hacerse con el fin de mejorar la actividad *in vivo* o el periodo de vida de los polinucleótidos de la invención.

Vectores nucleótidos y células anfitrionas

Los polinucleótidos de la invención pueden incorporarse en un vector recombinante replicable.

El vector puede usarse para replicar el ácido nucleico en una célula anfitriona compatible. De este modo, en otra realización, la invención provee un método para hacer polinucleótidos de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula anfitriona compatible y cultivando la célula anfitriona en condiciones que produzcan la replicación del vector. El vector puede ser recuperado de la célula anfitriona. Células anfitrionas adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura y hongos.

Preferiblemente, un polinucleótido de la invención en un vector está enlazado operativamente a una secuencia reguladora la cual puede proveer la expresión de la secuencia de codificación mediante la célula anfitriona, es decir, el vector es un vector de

expresión. La expresión "enlazado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la cual los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar para el fin que se les intenta dar. Una secuencia reguladora "enlazada operativamente" a una secuencia de codificación es ligada de tal modo que se logra la expresión de la secuencia de codificación bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. La expresión "secuencias reguladora" incluye promotores y reforzadores y otras señales de regulación de expresión.

La expresión reforzadora del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención también puede lograrse mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ej: regiones promotoras, líderes de secreción y terminadoras, las cuales sirven para aumentar la expresión y, si se desea, niveles de secreción de la proteína de interés del anfitrión de expresión escogido y/o para proveer el control inducible de la expresión del polipéptido de la invención.

Aparte del promotor nativo al gen que codifica el polipéptido de la invención, se pueden usar otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido de la invención. El promotor puede seleccionarse por su eficiencia en dirigir la expresión del polipéptido de la invención en el anfitrión de expresión deseado.

En otra realización, se puede seleccionar un promotor constitutivo para dirigir la expresión del polipéptido deseado de la invención. Ejemplos de promotores constitutivos y/o inducibles fuertes que se prefieren para uso en anfitriones de expresión fungal son los que se obtienen de los genes fungales para los promotores de xilanas (xlnA), fitasa, ATP.sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), alcohol deshidrogenasa (*AdhA*), α -amilasa (*amy*), amiglucoasidasa (AG-del gen *glaA*), acetamidasa (*amdS*) y gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*).

Ejemplos de promotores fuertes de levadura son los que se obtienen de los genes para alcohol deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato cinasa y triosafofosfato isomerasa.

Ejemplos de promotores fuertes bacterianos son los promotores α -amilasa y *SP02* así como los promotores de genes extracelulares de proteasa.

También se pueden usar promotores híbridos para mejorar la regulación inducible de la construcción de la expresión.

Frecuentemente, se aconseja que el polipéptido de la invención sea secretado del anfitrión de expresión en el medio de cultivo desde donde el polipéptido de la invención se puede recuperar más fácilmente. Según la presente invención, también se puede usar el

polipéptido de la secuencia líder nativa de secreción para efectuar la secreción del polipéptido expresado de la invención. Sin embargo, un aumento en la expresión del polipéptido de la invención a veces resulta en la producción de la proteína en niveles más allá de los que el anfitrión de la expresión puede procesar y secretar, creando un cuello de botella de tal modo que el producto de la proteína se acumule dentro de la célula. Por lo tanto, la presente invención también provee secuencias líderes heterólogas para proveer la secreción más eficiente del polipéptido de la invención del anfitrión de expresión escogido.

Según la presente invención, el líder de secreción puede seleccionarse con base en el anfitrión de expresión deseado. Se puede escoger un líder heterólogo de secreción que sea homólogo a las otras regiones reguladoras de la construcción de la expresión. Por ejemplo, se puede usar el líder de la proteína amiloglucosidasa (AG) altamente secretada en combinación con el promotor de amiloglucosidasa (AG) en sí, así como en combinación con otros promotores. En el contexto de la invención también se pueden usar secuencias de señal híbrida.

Ejemplos de secuencias líderes heterólogas de secreción son aquellas que se originan del gen fungal amiloglucosidasa (AG) (*gla* A – versiones de 18 y 24 aminoácidos por ej: *Aspergillus*), el gen factor- α (levaduras por ej: *Saccaromyces* y *Kluyveromyces*) o el gen α -amilasa (*Bacillus*).

Estos vectores pueden transformarse en una célula anfitriona adecuada según se describe arriba, para proveer la expresión de un polipéptido de la invención. Por ello, en otro aspecto, la invención provee un proceso para preparar polipéptidos según la invención, que comprende cultivar una célula anfitriona transformada o transfectada con un vector de expresión según se describe arriba, bajo condiciones que se provea la expresión por el vector de una secuencia codificadora que codifique los polipéptidos, y recupere los polipéptidos expresados. Células anfitrionas adecuadas incluyen, por ejemplo, células fungales, tales como *Aspergillus* y células de levadura, tales como las células de levadura del gen *Kluyveromyces* o *Saccaromyces*. A continuación trataremos otras células anfitrionas adecuadas.

Los vectores pueden ser por ejemplo, vectores plásmidos, virales o fagos provistos con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente, un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables. Los sistemas de selección más indicados para microorganismos industriales son aquellos formados por el grupo de marcadores de selección que no requieren una mutación en el organismo anfitrión. Ejemplos de

marcadores fungales de selección son los genes de acetamidasa (*amaS*), ATO sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), orotidina-5'-fosfato-decarboxilasa (*pvrA*), resistencia a fleomicin y benomil (*benA*). Ejemplos de marcadores no fungales de selección son el gen de resistencia bacteriana G418 (también puede usarse en levadura pero no en hongos), el gen de resistencia a ampicilina (*E. coli*), el gen de resistencia a nemomicina (*Bacillus*) y el gen *E. coli uidA*, que codifican β -glucoronidasa (GUS). Los vectores se pueden usar *in vitro* por ejemplo para la producción de ARN o usados para transfectar o transformar una célula anfitriona.

Otra realización de la invención provee células anfitrionas transformadas o transfectadas con un polinucleótido de la invención. Preferiblemente, dicho nucleótido es transportado en un vector para la replicación y expresión de dichos polinucleótidos. Las células serán escogidas para que sean compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo, células procariontas (por ejemplo bacterianas), fungales, de levadura o vegetales.

Las bacterias del gen *Bacillus* son muy adecuadas como anfitriones heterólogos debido a su capacidad para secretar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias adecuadas como anfitrionas son aquellas del género de *Streptomyces* y *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención, y/o el deseo de procesar más la proteína expresada, se pueden preferir células anfitrionas eucarióticas tales como levaduras u hongos. En general, se prefieren las células de levadura por encima de las células fungales ya que son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son secretadas deficientemente de la célula de levadura, o en algunos casos no son procesadas correctamente (por ej: hiperglicosilación en levadura). En estos casos, se debe seleccionar un organismo anfitrión fungal.

También se puede escoger un anfitrión heterólogo, en donde el polipéptido de la invención se produce en una forma que sea sustancialmente libre de otras xilanasas. Esto puede lograrse escogiendo un anfitrión que normalmente no produzca este tipo de enzimas.

Ejemplos de anfitriones de expresión preferidos dentro del alcance de la presente invención son hongos tales como las especies *Aspergillus* y las especies *Trichoderma*; las bacterias como las especies *Bacillus*, *Streptomyces* y *Pseudomonas*; y levaduras tales como *Kluyveromyces* y *Saccharomyces*.

Los anfitriones de expresión especialmente preferidos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *yubigenis*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulas*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*,

Bacillus licheniformis, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Según la presente invención, se puede hacer la producción del polipéptido de la invención cultivando anfitriones de expresión microbianos que hayan sido transformados con uno o más polinucleótidos de la presente invención, en un medio convencional de fermentación nutricional.

El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contenga una fuente de carbono (por ej: glucosa, maltosa, melaza, etc), una fuente de nitrógeno (por ej: sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc.) una fuente de nitrógeno orgánico (por ej: extracto de levadura, extracto de malta, peptona, etc.) y fuentes nutritivas inorgánicas (por ej: fosfato, magnesio, potasio, cinc, hierro, etc.). Opcionalmente, se puede agregar un inductor.

La selección del medio apropiado puede basarse en la selección de anfitriones de expresión y/o basarse en los requerimientos reguladores de la construcción de expresión. Este tipo de medios son conocidos por las personas versadas en la técnica. Si se desea, el medio puede contener componentes adicionales que favorecen los anfitriones de expresión transformados sobre otros microorganismos potencialmente contaminantes.

Luego de la fermentación, se pueden remover las células del caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Una vez se remuevan las células se puede recuperar el polipéptido variante de la invención y si se desea, se puede purificar y aislar por medios convencionales.

Organismos

La expresión "organismo" en relación con la presente invención, incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia nucleotídica que codifica la proteína de xilanasa variante según la presente invención y/o productos que se obtienen de la misma, en donde una secuencia reguladora transcripcional puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica según la presente invención, cuando está presente en el organismo. Organismos adecuados pueden incluir un procarionte, hongo, levadura o una planta. Para el aspecto de xilanasa de la presente invención, un organismo preferible puede ser una bacteria, preferiblemente del gen *Bacillus*, más preferiblemente *Bacillus subtilis*.

La expresión "organismo transgénico" en relación con la presente invención, incluye cualquier organismo que comprenda la secuencia nucleotídica que codifica la proteína según la presente invención y/o productos que se obtienen de lo mismo, en donde la secuencia

27
25

reguladora transcripcional puede permitir la expresión de la secuencia nucleótida según la presente invención, dentro del organismo. Preferiblemente, la secuencia nucleótida se incorpora en el genoma del organismo.

La expresión "organismo transgénico" no cubre secuencias codificadoras nucleótidas nativas en su ambiente natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que también esté en su ambiente natural.

Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende cualquiera de, o combinaciones de la secuencia nucleótida que codifica la secuencia de aminoácidos según la presente invención, construcciones según la presente invención (incluidas combinaciones de lo mismo), vectores según la presente invención, plásmidos según la presente invención, células según la presente invención, tejidos según la presente invención o los productos de lo mismo. La célula u organismo transformado puede preparar cantidades aceptables del compuesto deseado que fácilmente se pueda recuperar de la célula o del organismo.

Transformación de Células Anfitrionas/Organismos Anfitriones

Como ya se dijo, el organismo anfitrión puede ser un organismo eucariótico o procariótico. Ejemplos de anfitriones procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las enseñanzas sobre la transformación de anfitriones procarióticos están documentadas en la técnica, ver por ejemplo, Sambrook y colaboradores (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da Ed. 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel y colaboradores, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999), 4ª. Ed. John Wiley & Sons, Inc.

Si se usa un anfitrión procariótico, entonces se puede necesitar la secuencia nucleótida para que sea modificada adecuadamente antes de la transformación – tal como mediante la remoción de intrones.

Como ya se dijo, un organismo anfitrión preferido es del gen *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*.

En otra realización, el organismo transgénico puede ser una levadura. En este aspecto, las levaduras también se han usado ampliamente como un vehículo para la expresión del gen heterólogo. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene una larga historia de uso industrial, incluido su uso para expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* fue revisada por Goodey y colab. (1987, *Yeast Biotechnology*, D R Berry y colaboradores, eds. Pags 401-429, Allen and Unwin, London) y por King y

colaboradores (1989, *Molecular and Cell Biology of Yeasts*, E F Walton and G T Yarronton, eds, pags 107-133, Blackie, Glasgow).

25
26

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es indicado para la expresión de genes heterólogos. Primero, es no patógeno para los seres humanos y no puede producir ciertas endotoxinas. Segundo, cuenta con una larga historia de uso seguro luego de siglos de explotación comercial para varios propósitos. Esto ha llevado a una amplia aceptación del público. Tercero, el amplio uso comercial y la investigación que se ha dedicado al organismo, han dado como resultado una riqueza de conocimiento acerca de la genética y la fisiología, así como en características de fermentación a grande escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

Una revisión de los principios de expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de productos de gen la presenta E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expresión of heterologous genes", *Yeasts*, Col. 5, Anthony H Rose & J Stuart Harrison, eds, 2ª, edición Academic Press Ltd).

Se consiguen varios tipos de vectores de levadura, incluidos vectores integrativos, que requieren la recombinación con el genoma anfitrión para su mantenimiento, y vectores plásmidos de replicación autónoma.

Para preparar los *Saccharomyces* transgénicos, las construcciones de expresión se preparan insertando la secuencia nucleótida de la presente invención en una construcción diseñada para expresión en levadura. Ya han sido desarrollados varios tipos de construcciones usadas para la expresión heteróloga. Las construcciones contienen un promotor activo en levadura fusionado a la secuencia nucleótida de la presente invención, usualmente un promotor de origen de levadura, tal como el promotor GAL1. Comúnmente, se usa una secuencia de señal de origen de levadura, tal como la secuencia que codifica el péptido de señal SUC2. Un terminador activo en levadura termina el sistema de expresión.

Para la terminación de levadura se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, un *Saccharomyces* transgénico según la presente invención puede prepararse observando las enseñanzas de Hinne y colaboradores (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Begas, J D (1978, *Nature*, London 275, 204); e Ito, H y colaboradores (1983, *J Bacteriology* 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas son seleccionadas usando varios marcadores selectivos. Entre los marcadores usados para transformación se encuentra un número de

marcadores auxotróficos tales como LEU2, HIS4 y TRIP1, y marcadores dominantes de resistencia a antibióticos tales como marcadores antibióticos aminoglicósidos, como G418.

Otro organismo anfitrión es una planta. El principio básico en la construcción de plantas modificadas genéticamente es insertar la información genética en el genoma de la planta y así obtener un mantenimiento estable del material genético insertado.

Una planta transgénica de la invención puede producirse de cualquier planta tales como plantas con semillas (angiospermas) y coníferas. Los angiospermas incluyen dicotiledóneos y monocotiledóneos. Ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen tabaco, (*Nicotiana plumbaginifolia* y *Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), *Brassica napus*, *Brassica nigra*, *Datura innoxia*, *Vicia narbonensis*, *Vicia faba*, arveja (*Pisum sativum*), coliflor, clavel y lenteja (*Lens culinaris*). Ejemplos de plantas monocotiledóneas incluyen cereales tales como trigo, cebada, avenas y maíz.

Las técnicas para producir plantas transgénicas son conocidas en el campo. Típicamente, plantas enteras, células o protoplastos se pueden transformar con un a construcción adecuada de ácido nucleico que codifique una molécula de cinc o un ADN objetivo (ver arriba ejemplos de construcciones de ácido nucleico). Existen muchos métodos para introducir la transformación de construcciones ADN en células, pero no todos son adecuados para entregar ADN a las células vegetales. Algunos métodos adecuados incluyen infección de *Agrobacterium* (ver, entre otros, Turpen y colaboradores, 1993, *J. Virol. Methods*, 42:227-239) o entrega directa de ADN tal como por ejemplo, por transformación mediada por PEG, electroporación o aceleración de partículas recubiertas con ADN. Generalmente se prefieren los métodos de aceleración e incluyen, por ejemplo, bombardeo de microproyectiles. Más adelante se describe un protocolo típico para producir plantas transgénicas (en particular monocotiledóneos) tomado de la Patente estadounidense No. 5,874,265.

Un ejemplo de un método para entregar segmentos ADN de transformación a las células vegetales es bombardeo de microproyectiles. En este método, las partículas no biológicas se pueden recubrir con ácidos nucleicos y entregarse en células mediante una fuerza propulsora. Algunas partículas de ejemplo incluyen aquellas compuestas por tungsteno, oro, platino y similares.

Una ventaja particular de bombardeo de microproyectiles, además de ser un medio efectivo de transformar establemente y de manera reproducible los dicotiledóneos y los monocotiledóneos, es que no se requiere ni el aislamiento de protoplastos ni la susceptibilidad a la infección *Agrobacterium*. Una realización ilustrativa de un método

26
27

27
28

para entregar ADN en plantas vegetales por aceleración es un sistema de entrega biolística de partículas (*Biolistics Particle Delivery System*), el cual puede usarse para propulsar las partículas recubiertas con ADN a través de un tamiz, tal como un tamiz de acero inoxidable o Nytex, sobre una superficie de filtro cubierta con células vegetales cultivadas en suspensión. El tamiz dispersa las partículas tungsteno-ADN de modo que no sean entregadas a las células receptoras en grandes agregados. Se cree que sin la intervención de un tamiz entre el aparato proyectil y las células que vayan a ser bombardeadas, los proyectiles se agrupan y pueden ser demasiado grandes para alcanzar una alta frecuencia de transformación. Esto puede deberse al daño causado en las células receptoras por los proyectiles que son demasiado grandes.

Para el bombardeo, se prefiere que las células en suspensión se concentren en filtros. Los filtros que contienen las células que vayan a ser bombardeadas se colocan a una distancia adecuada por debajo del plato que detiene el macroproyectil. Si se desea, también se coloca uno o más tamices entre la pistola y las células que vayan a ser bombardeadas. Mediante el uso de las técnicas que se contemplan aquí, se pueden obtener hasta 1000 o más grupos de células que expresen transitoriamente un gen marcador ("foci") en el filtro bombardeado. El número de células en un foco que expresa el producto del gen exógeno 48 horas después del bombardeo, varía entre 1 y 10, con un promedio de 2 a 3.

Luego de efectuar la entrega de ADN exógeno a las células receptoras por cualquiera de los métodos anteriores, un paso preferido es identificar las células transformadas para posterior cultivo y regeneración de la planta. Este paso puede incluir ensayar cultivos directamente para un rasgo tamizable, o exponiendo los cultivos bombardeados a un agente selectivo.

Un ejemplo de un rasgo de marcador tamizable es el pigmento rojo producido bajo el control de R-locus en maíz. Este pigmento puede detectarse cultivando células en un soporte sólido que contenga medios nutrientes capaces de soportar el crecimiento en esta etapa, incubando las células a por ej: 18°C y más de 180 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y seleccionando células de colonias (agregados visibles de células) que estén pigmentadas. Estas células pueden cultivarse, bien sea en suspensión o en medios sólidos.

Una realización de los métodos para identificar las células transformadas implica exponer los cultivos bombardeados a un agente selectivo, tal como un inhibidor metabólico, un antibiótico, herbicida, o similar. Las células que hayan sido transformadas y tengan integrado establemente un gen marcador que confiera resistencia al agente selectivo usado, crecerán y se dividirán en cultivo. Las células sensibles no se dejarán cultivar más.

5/8
29

Para usar el sistema selectivo bar-bialaphos, las células bombardeadas en filtros son resuspendidas en un medio líquido no selectivo, cultivadas (por ej: durante 1 o 2 semanas) y transformadas a filtros superpuestos al medio sólido que contenga 1-3 mg/l bialaphos. Si bien se prefieren rangos entre 1 y 3 mg/l, se propone que rangos entre 0,1 y 50 mg/l encontrarán utilidad en la práctica de la invención. No se considera que sea especialmente crucial el tipo de filtro para uso en el bombardeo, y puede comprender cualquier soporte sólido, poroso o inerte.

Las células que sobreviven a la exposición del agente selectivo pueden ser cultivadas en medios que soporten la regeneración de plantas. El tejido es mantenido en un medio básico con hormonas durante 2 a 4 semanas, y luego transferido al medio sin las hormonas. Luego de 2 a 4 semanas el desarrollo de retoños indicará el tiempo para transferirlo a otro medio.

Típicamente, la regeneración requiere una progresión de medios cuya composición haya sido modificada para proveer los nutrientes adecuados y las señales hormonales durante las etapas secuenciales del desarrollo del callo transformado a la planta más madura. Las planteletas que se vayan desarrollando son transferidas al suelo y endurecidas, por ej: en una cámara de clima controlado a aproximadamente 85% de humedad relativa, 600 ppm CO₂ y 250 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz. Preferiblemente, las plantas son maduradas bien sea en una cámara de cultivo o en un vivero. Típicamente, la regeneración tomará entre 3 y 12 semanas. Durante la regeneración, las células son cultivadas en medios sólidos en vasos de cultivo de tejido. Una realización ilustrativa de un vaso es un plato petri. Preferiblemente, las plantas que se regeneran se cultivan a temperaturas entre 19°C y 28°C. Una vez las plantas regeneradas han alcanzado la etapa de retoño y desarrollo de raíz, pueden ser transferidas a un vivero para que sigan creciendo y para pruebas.

El ADN genómico puede aislarse de líneas y plantas de células callosas para determinar la presencia del gen exógeno mediante el uso de técnicas conocidas tales como secado PCR y/o Southern.

Existen varias técnicas para insertar la información genética, siendo los principales, la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genética mediante el uso de un sistema vector. Una revisión de las técnicas generales se puede encontrar en los artículos de Prykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* [1991] 42:205-225) y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* Marzo/Abril 1994 17-27).

Por ello, en un aspecto, la presente invención se refiere a un sistema vector que porta una construcción que codifica un polipéptido de xilanas variante según la invención y que puede introducir la construcción en el genoma de una planta.

El sistema vector puede comprender un vector, pero puede comprender al menos dos vectores. En el caso de dos vectores, normalmente el sistema vector se refiere como un sistema de vector binario. Los sistemas vectores binarios se describen en mayor detalle en Gynheung An y colaboradores (1980) *Binary Vectors, Plant Molecular Biology Manual* A3, 1-19)

Un sistema usado ampliamente para la transformación de células vegetales con un promotor determinado o secuencia nucleótida o constructor, se basa en el uso de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o un plásmido Ri de *Agrobacterium rhizogenes* (An y colaboradores (1986), *Plant Physiol.* 81, 301-305 y Butcher D.N. y colaboradores (1980) *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, eds. D.S. Ingrams & J.P. Helgeson, 203-208).

Se han construido varios plásmidos diferentes Ti y Ri adecuados para la hacer las construcciones de la planta o de células vegetales que se describen arriba.

B. Usos

En un sentido general, una xilanasa variante de la invención puede usarse para alterar , por ejemplo reducir, la viscosidad derivada de la presencia de hemicelulosa o arabinoxilano en una solución o sistema que comprenda material de pared de célula vegetal. Típicamente, dichos materiales de pared de célula vegetales comprenderán uno o más inhibidores de xilanasa.

Específicamente, una xilanasa variante de la invención puede usarse para el procesamiento de materiales vegetales para uso como artículos alimenticios, tales como alimento para animales, producción de almidón, panadería y el procesamiento de pulpa de madera para hacer papel.

Preparación de productos alimenticios

Se puede usar una xilanasa variante de la invención para procesar materiales vegetales tales como cereales usados en productos alimenticios, incluidos alimentos para animales. Tal como se usa en este contexto, la expresión "cereal" significa cualquier clase de grano usado para alimento y/o cualquier pasto que produzca este grano, tal como, más no limitado a trigo, trigo molido, cebada, maíz, sorgo, centeno, avena y arroz o combinaciones de lo mismo. En una realización preferida, el cereal es un cereal de trigo.

El xilano en el alimento y/o suplemento alimenticio es modificado mediante contacto del xilano con la xilanasa variante de la presente invención.

Tal como se usa en este contexto, la expresión "mediante contacto" incluye, pero no se limita a rociar, revestir, impregnar o cubrir el alimento y/o el suplemento alimenticio con la enzima de xilanasa variante de la presente invención.

En una realización, el alimento y/o suplemento alimenticio de la presente invención puede prepararse mezclando directamente la enzima de xilanasa variante con un alimento y/o suplemento alimenticio. A modo de ejemplo, la enzima de xilanasa variante puede contactarse (por ejemplo por rociado) en un alimento basado en cereal y/o suplemento alimenticio tal como trigo molido, maíz o harina de soya.

También es posible incorporar la enzima de xilanasa variante en un segundo (diferente) alimento y/o suplemento alimenticio o agua pura que luego es agregada al alimento y/o suplemento alimenticio de la presente invención. Por lo tanto, no es esencial que la enzima de xilanasa variante de la presente invención sea incorporada al alimento basado en cereal y/o suplemento alimenticio en sí, aunque tal incorporación forma un aspecto especialmente preferido de la presente invención.

En una realización de la presente invención, el alimento y/o suplemento alimenticio puede combinarse con otro alimento y/o componentes alimenticios para producir el alimento basado en cereal y/o el suplemento alimenticio. Esos otros alimentos y/o componentes alimenticios pueden incluir uno o más suplementos de enzima (preferiblemente termoestables) alimento vitamínico y/o suplementos alimenticios, alimento mineral y/o suplementos alimenticios y alimentos de aminoácidos y/o suplementos alimenticios. El alimento resultante (combinado) y/o suplemento alimenticio comprende posiblemente varios tipos diferentes de compuestos que luego pueden ser mezclados en una cantidad apropiada con el otro alimento y/o componentes alimenticios tales como suplementos de cereal y proteína para formar un alimento para seres humanos y/o un alimento para animales.

En una realización preferida, el alimento y/o suplemento alimenticio de la presente invención puede prepararse mezclando diferentes enzimas que tengan las actividades apropiadas para producir una mezcla de enzima. A modo de ejemplo, un alimento basado en cereal y/o suplemento alimenticio formado de por ej: trigo molido o maíz, se puede contactar (por ej: por rociado) bien sea simultánea o secuencialmente con la enzima de xilanasa y otras enzimas que tengan actividades apropiadas. Estas enzimas pueden incluir, pero no se limitan, a uno o más de amilasa, glucoamilasa, mannasa, galactosidasa, fitasa, lipasa, glucanasa, arabinofuranosidasa, pectinasa, proteasa, oxidasa de glucosa, hexosa oxidasa y xilanasa. Las enzimas que tengan actividades desecadas pueden ser mezcladas,

por ejemplo con la xilanasa de la presente invención, ya sea antes de contactar estas enzimas con un alimento basado en cereal y/o suplemento alimenticio o alternativamente, dichas enzimas pueden contactarse simultánea o secuencialmente en dicho suplemento basado en cereal. El alimento y/o suplemento alimenticio es mezclado con un alimento basado en cereal y/o suplemento alimenticio para preparar el alimento y/o suplemento alimenticio final. También es posible formular el alimento y/o el suplemento alimenticio como una solución de las actividades de la enzima individual, y luego mezclar esta solución con un alimento y/o material alimenticio antes de procesar el alimento y/o suplemento alimenticio en gránulos o como una pasta.

Productos de panadería

La presente invención provee el uso de un polipéptido de xilanasa variante de la invención en un proceso para preparar un producto alimenticio. Los productos típicos de panadería (horneados) de acuerdo con la presente invención incluyen pan – como en barra, panecillo, roscones, tortillas, ponqués, galletas, tostadas, etc. En la técnica es bien conocida la preparación de productos alimenticios tales como productos de panadería. El ejemplo 2 describe la producción de pasta. El ejemplo 5 describe el uso de la xilanasas variantes de la invención para alterar la viscosidad de una masa de harina.

Producción de almidón

También se puede usar una xilanasa de la presente invención para la producción de almidón de materiales vegetales derivados de cereales y tubérculos, tales como papas.

Procesamiento de pulpa de madera

También se puede usar una xilanasa de la presente invención para el procesamiento de pulpa de madera, por ejemplo, para la preparación de papel.

Como ya se dijo, hemos demostrado que un determinante mayor de la funcionalidad de xilanasa es la presencia de inhibidores endógenos en material vegetal. Por lo tanto, aunque un método para alterar la funcionalidad de xilanasa es modificar una xilanasa para que cambie su sensibilidad a los inhibidores endógenos, otro método sería la cantidad y/o el tipo del inhibidor presente en el material vegetal. Por ello, la presente invención también provee el uso de un inhibidor de xilanasa para alterar la funcionalidad de una xilanasa y en consecuencia, el uso de un inhibidor de xilanasa en los métodos de procesamiento de materiales vegetales arriba descritos.

Ahora describiremos la presente invención con referencia a los siguientes ejemplos cuyo propósito es que sean únicamente ilustrativos y no limitantes.

32
33

EJEMPLOS

Ejemplo 1 – Purificación y caracterización del inhibidor de xilanasa endógena de trigo

Se extrajeron con agua 2kg de harina de trigo (Danish Reform, lote 99056) en la proporción harina:agua de 1:2, agitando durante 10 minutos. Se separó por centrifugación el inhibidor de xilanasa endógena soluble de la suspensión harina:agua. La extracción y la centrifugación se hicieron a 4°C. El inhibidor se purificó del extracto de agua mediante las siguientes técnicas de cromatografía y concentración: HPLC-SEC, HPLC-CIED, evaporación rotatoria, HPLC-HIC, HPLC-SEC y evaporación rotatoria. Durante la purificación se pudo monitorear y cuantificar el inhibidor de xilanasa usando el siguiente método de cuantificación.

Método de cuantificación del inhibidor

1 XIU (Unidad de Inhibidor de Xilanasa) se define como la cantidad de inhibidor que reduce 1TXU a 0,5 TXU bajo las condiciones arriba descritas.

La xilanasa usada en este ensayo fue la xilanasa *Bacillus subtilis* tipo silvestre.

Se preincubaban durante 5 minutos a 40°C 250 µl de solución de xilanasa que contiene 12 TXU/ml aproximadamente, 100 µl de solución del inhibidor de xilanasa y ácido cítrico (0,1 M) –di-fosfato de hidrógeno sódico (0,2) tamponador, pH5, para reaccionar un volumen de reacción de 1000 µl. En tiempo = 5 minutos, a la mezcla de reacción se le agrega una tableta de Xilazima (Megazyme, Irlanda). En tiempo = 15 minutos se termina la reacción mediante la adición de 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH12. Se filtra la solución y la absorbencia del sobrenadante se mide a 590 nm. Escogiendo diferentes concentraciones del inhibidor en el ensayo anterior, es posible crear un gráfico de OD vr. concentración del inhibidor. Usando la inclinación (a) y la intersección (b) de este gráfico y la concentración de la xilanasa, es posible calcular la cantidad de XIU en una solución de inhibidor en particular (ecuación 1).

Ecuación 1 cantidad de XIU en solución = $((b/2/-a)/TXU)$

De la purificación del inhibidor de xilanasa endógena, se recuperó el siguiente producto inhibidor (Tabla 1).

Tabla 1. Recuperación del inhibidor de xilanasa endógena de trigo después de purificación

Muestra	Cantidad	XIU	XIU total	% Recuperación
Harina	2000 g	590/g	1,180,000	100
Inhibidor purificado	90 ml	4658/ml	419,200	35,5

La muestra del inhibidor era pura y libre de actividades xilanóticas endógenas de trigo.

Ejemplo 2 - Fraccionamiento y reconstrucción de harina de trigo libre del inhibidor de xilanasa y funcionalidad de xilanasas en esta harina como una función del inhibidor de xilanasa adicionado.

Fraccionamiento y reconstrucción de harina

La harina que se usó fue harina Danish Reform, Lote No. 99056. El fraccionamiento, la inactivación y reconstrucción del inhibidor fue así:

Se hizo una masa mezclando 1600 gramos de harina, con adición óptima de agua de acuerdo con una absorción a 500 BU y mezclando el tiempo de acuerdo con los resultados Farinograph. Esto dio como resultado una masa de 2512 gramos. Se sacó el gluten manualmente de la masa, usando una proporción agua:masa de 5:1. El agua que se usó se pre-enfrió a 4°C para evitar mayor actividad de la enzima en la masa. El gluten se lavó manualmente. La mezcla sin agua contenía proteínas solubles (incluido el inhibidor de xilanasa), lípidos, polisacáridos sin almidón y almidón. El almidón y los demás componentes no solubles se separaron de la masa sin agua mediante centrifugación (5000 g por 10 minutos a 10°C). Para inactivar el inhibidor de xilanasa endógena en la masa sin agua, se hirvió el sobrenadante de la centrifugación durante 3 minutos usando un evaporador de calor.

Todas las tres fracciones (gluten, almidón y solubles) se congelaron en matraces y se colocaron en un liofilizador (secado en congelado) Luego del secado, se pesaron las fracciones, se molieron usando un mortero, un filtro para café y se coló en un tamiz de 250µm. Se pesaron nuevamente todas las fracciones y se reconstituyó la harina con base en las proporciones que se obtuvieron después del fraccionamiento.

Enzimas

En el estudio se usaron las xilanasas de la Tabla 2. Las xilanasas son purificadas, lo cual significa que no hay ninguna otra actividad xilonolítica presente en la muestra.

33
34

ID	Origen	TXU
<i>B. sub</i>	<i>B. subtilis</i>	5100
<i>A. nig.</i>	<i>A. niger</i>	8800

Ensayo de xilanasa (actividad Endo- β -1,4-xilanasa)

Se diluyeron muestras de xilanasa en ácido cítrico (0,1 M) tamponador *-di*-fosfato de hidrógeno sódico (0,2 M), pH 5 para obtener aproximadamente OD = 0,7 en el ensayo final. Se someten a termostato durante 5 minutos a 40°C tres diluciones de la muestra y un estándar interno con una actividad definida. En tiempo = 5 minutos, a la solución de la enzima se agrega un marcador de Xilazyma (substrato de xilano tinturado, de enlace cruzado). En tiempo = 15 minutos (o en alguno casos más tiempo dependiendo de la actividad de xilanasa presente en la muestra) se termina la reacción, agregando 10 ml de TRIS al 2%. La mezcla de la reacción es centrifugada y el OD del sobrenadante se mide a 590 nm. Teniendo en cuenta las diluciones y la cantidad de xilanasa, se puede calcular la actividad (TXU, Total Unidades Xilanasa) de la muestra con respecto al estándar.

Pruebas en horneado

Se hicieron pruebas en horneado con (1,44 x nivel de inhibidor inicial en harina Danish Reform, lote No. 99056) y sin adición de inhibidor de xilanasa endógena purificada a la harina reconstituida. Las pruebas se hicieron usando las xilanasas que se muestran en la Tabla 2 y las composiciones que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de la masa hecha dentro de las pruebas de horneado.

Masa No.	ID	TXU	Adición inhibidor, XIU/50g
1	Control	0	0
2	<i>B. sub</i>	7500	0
3	<i>A. nig</i>	7500	0
4	<i>A. nig</i>	7500	850
5	<i>B. sub</i>	7500	850
6	Control	0	850

Análisis de la masa

Se analizó la masa con respecto a:

Pegajosidad

Se midió la pegajosidad de la masa en un sistema TX-XT2 (Sistemas *Stable Micro*) usando una celda de pegajosidad de masa SMA (*SMS Dough Stickiness Cell*) según el método descrito por Chen & Hoseny (Lebensmittel Wiss. U - *Technol.*, 28, 467-473. 1995)

Análisis de Pegajosidad del líquido de la masa

La viscosidad del líquido de la masa extraído se midió usando un viscosímetro Brookfield luego de la extracción.

Análisis de pentosan del líquido de la masa

Se midió el pentosan solubilizado en el líquido de la masa usando el método de Rouau & Sargent (*Carbohydrate polymers*, 24, 123-132, 1994)

RESULTADOS**Fraccionamiento y reconstitución de harina**

El fraccionamiento y la reconstitución de la masa resultó en un gluten liofilizado de 168,15 gramos de gluten liofilizado, 111,13 gramos de fracción soluble liofilizada y 1143,56 gramos de almidón liofilizado.

Cuantificación del inhibidor en la harina

Usando el método de cuantificación del inhibidor, se pudo detectar el nivel del inhibidor en la harina 99056 y de la harina reconstituida. La tabla muestra los resultados de estos análisis.

Tabla 4. Resultados de la cuantificación del inhibidor en harina nativa (99056) y harina reconstituida.

Harina	Concentración del inhibidor, harina XIU/g
99056	590
Harina reconstituida	42

Comparando el nivel del inhibidor en las dos porciones de harina, se muestra una disminución de 93% ($100 - (42\text{XIU}/590\text{XIU} \times 100\%)$) del nivel del inhibidor en la harina reconstituida.

Pruebas de horneado

Las Tablas 5 y 6 muestran los resultados de la prueba de horneado.

Tabla 5. Datos de pruebas de horneado con harina reconstituida, xilanasa y +/- adición del inhibidor.

36
39

ID	TXU	Inh. XIU/50g	Promedio volumen espec. ml/gramos	Desvío estándar %
Control	0	42	3,04	4,06
<i>B. sub</i>	7500	42	3,23	12,51
<i>A. nig</i>	7500	42	3,44	5,24
<i>B. sub</i>	7500	850	3,22	4,26
<i>A. nig</i>	7500	850	3,38	0,70
Control	0	850	2,94	0,05

El desvío estándar que muestra la Tabla 5 refleja las propiedades de manejo de la masa de la masa probada. La masa que se hizo sin el inhibidor de xilanasa endógena (42 XIU) fue muy difícil de manejar. El desvío estándar para esta masa es aproximadamente entre 3 y 12,5%. En comparación con la masa a la que se le había agregado el inhibidor, es bastante alto. Si se comparan estas desviaciones estándar con los cambios reales en el volumen del pan, se puede observar que las cifras tienen aproximadamente el mismo valor. Esto significa que no podemos concluir nada acerca de la ausencia de la influencia del inhibidor en el volumen del pan. Si observamos la masa hecha con la adición del inhibidor de xilanasa endógena (850 XIU) en la Tabla 5, podemos ver que pudimos producir pan de la harina reconstituida de manera reproducible en un periodo de dos días. La desviación estándar estuvo dentro de 0,05 a 4,2%, lo cual es aceptable. En la Tabla 6 se puede observar que todas las xilanasas aumentaron el volumen del pan horneado.

Tabla 6. Aumento de volumen en pan horneado de harina reconstituida como una función de xilanasa y adición del inhibidor de xilanasa.

ID	TXU	Inh. XIU/50g	Promedio espec. volumen ml/gramos	Aumento volumen como función de xilanasa %
Control	0	42	3,04	0,0
<i>B. sub</i>	7500	42	3,23	6,2
<i>A. nig</i>	7500	42	3,44	13,3
<i>B. sub</i>	7500	850	3,22	9,7
<i>A. nig</i>	7500	850	3,38	15,0
Control	0	850	2,94	0,0

De las Tablas 5 y 6 se puede deducir que la ausencia del inhibidor de xilanasa en la harina hizo muy difícil el manejo de la masa. Por lo tanto, lo que puede parecer como una respuesta positiva en volumen mediante la adición del inhibidor en la Tabla 6, probablemente se puede explicar por el alto desvío estándar en la masa a la que le faltaba el inhibidor, debido a las propiedades de difícil manejo. Además, se puede concluir que todas las xilanasas probadas aumentaron considerablemente el volumen del pan en comparación con el control de la muestra en blanco.

Pegajosidad

La misma masa que se usó para las pruebas de horneado, se usó para las medidas de pegajosidad. La Tabla 7 muestra los resultados.

Tabla 7. Datos que representan la pegajosidad como una función de tiempo, xilanasa y adición del inhibidor de xilanasa a la harina reconstituida.

ID	TXU	Inh. XIU/50g	Promedio pegajosidad luego de 10 min. g x s	Promedio pegajosidad luego de 60 min. g x s
Control	0	42	4,71	4,79
<i>B. sub</i>	7500	42	12,20	13,39
<i>A. nig</i>	7500	42	9,22	12,58
<i>B. sub</i>	7500	850	2,51	3,66
<i>A. nig</i>	7500	850	5,24	6,45
Control	0	850	4,10	4,15

Los resultados en la Tabla 7 indican claramente la influencia del inhibidor que se observó en el experimento. La masa con un nivel bajo de inhibidor de xilanasa en combinación con xilanasa, fue muy difícil de manejar y moldear. Sin embargo, cuando se agregó el inhibidor, la masa se secó y se hizo fácil de manejar. Tal como se puede observar de la Tabla 7, la adición de la xilanasa 990202 en combinación con el inhibidor redujo la pegajosidad. La masa se volvió más seca.

La Tabla 7 también muestra que existe solo un pequeño efecto de tiempo en la pegajosidad. Tal parece que las xilanasas actúan muy rápidamente. Dentro de los primeros 10 minutos, la mayoría del arabinoxilan se modifica cuando se agrega la primera xilanasa (*B. Sub*). La segunda xilanasa probada (*A. nig*) parece que actúa con menor

rapidez. Usando esta xilanasa, se puede observar fácilmente una función de tiempo. Esta es también la xilanasa que muestra el menor efecto como una función del nivel del inhibidor cuando se analiza la pegajosidad.

Viscosidad de la masa

Los resultados de viscosidad de la masa y el análisis de pentosan se obtuvieron de la misma extracción de masa preparada de harina reconstituida a la que se le agregó xilanasa e inhibidor de xilanasa. La masa se analizó luego de dos tiempos de prueba, 30 y 120 minutos

La Tabla 8 muestra los resultados del análisis de viscosidad.

Tabla 8. Datos que representan la viscosidad líquida de la masa como una función de tiempo, adición de xilanasa e inhibidor de xilanasa a harina reconstituida.

ID	TXU	Inh. XIU/50g	Promedio v viscosidad masa, cP, prueba 30 minutos	Promedio viscosidad masa, cP, prueba 120 minutos
Control	0	42	5,21	5,56
<i>B. sub</i>	7500	42	5,07	4,55
<i>A. nig</i>	7500	42	5,78	4,14
<i>B. sub</i>	7500	850	9,03	11,09
<i>A. nig</i>	7500	850	8,44	8,55
Control	0	850	5,96	6,95

Tal como se puede observar de la Tabla 8, el inhibidor tiene un efecto significativo en la funcionalidad de las xilanasas. Sin la adición del inhibidor, el arabinoxilan se despolimeriza a arabinoxilan de peso molecular bajo (LMW) (*Low Molecular Weight*). La adición del inhibidor evita esta extensa despolimerización del arabinoxilan.

Análisis de pentosan del líquido de la masa

La Tabla 9 presenta los resultados del análisis de pentosa (arabinoxilan) del líquido de la masa.

Tabla 9. Datos que representan la solubilización como una función de tiempo adición de xilanasa e inhibidor de xilanasa a harina reconstituida.

40 39

ID	TXU	Inh. XIU/50g	Promedio pentosan, % prueba 30 minutos	Promedio pentosan % prueba de 120 minutos
Control	0	42	0,387	0,458
B. sub	7500	42	0,766	0,819
B.A. nig	7500	42	0,719	0,798
B. sub	7500	850	0,410	0,544
A. nig	7500	850	0,560	0,673
Control	0	850	0,400	0,528

Tal como puede observarse de los resultados en la Tabla 9, la adición del inhibidor de xilanasa endógena redujo la solubilización del arabinoxilan. Cuando se evaluó luego de 30 minutos de prueba, la cantidad de arabinoxilan solubilizada en ausencia del inhibidor es casi el doble de la cantidad en presencia del inhibidor. Calculada sobre la base de las respectivas muestras de control, la solubilización es mucho más alta en ausencia del inhibidor, tal como se ilustra en el siguiente ejemplo:

$$(0,766-0,387)/(0,410 - 0,400) = \text{solubilización } 37,9 \text{ veces más alta.}$$

El anterior ejemplo se calculó sobre la base de solubilización del arabinoxilan usando la xilanasa *Bacillus*, con una prueba de 30 minutos y +/- inhibidor.

Ejemplo 3 – Mutagenesis en xilanasas dirigida en el sitio

Se pueden obtener mutantes específicos de la xilanasa *Bacillus subtilis* mediante mutagenesis dirigida en sitio de la enzima tipo silvestre, usando cualquier número de kits de mutagenesis comerciales. El siguiente es un ejemplo de cómo obtener el mutante D11F usando el kit *Quick Exchange* de Stratagene Cloning Systems, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037 USA:

La secuencia ADN que codifica la xilanasa A *Bacillus subtilis* fue publicada por Paice y colaboradores, 1986.

La secuencia de la región codificadora, con la secuencia que codifica la parte madura de la proteína se muestra en mayúsculas:

catatgttitaagttttaaaaagaatttcttagttggattatcggcagctttaatgagtatt
agcttgtttttcggcaaccgcctctgca GCTAGCACAGACTACTGGCAAAATTGGACTGAT

GGGGGCGGTATAGTAAACGCTGTCAATGGGTCTGCCGGAATTACAGTGTTAATTGGTCT
 AATACCGGAAATTTTGTGTTGGTAAAGGTTGGACTACAGGTTGCCATTTAGGACGATA
 AACTATAATGCCGGAGTTTGGGCGCCGAATGGCAATGGATATTTAACTTTATATGGTTGG
 ACGAGATCACTCTCATAGAATATTATGTAGTGGATTTCATGGGGTACTTATAGACCTACT
 GGAACGTATAAAGGTAAGTGTAAAAAGTGATGGGGGTACATATGACATATATACTACA
 CGTTATAACGCACCTTCCATTGATGGCGATCGCACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGTT
 CGCCAGTCGAAGAGACCAACCGGAAGCAACGTCACAATCACTTTCAGCAATCATGTGAAC
 GCATGGAAGAGCCATGGAATGAATCTGGGCAGTAATTGGGCTTACAAGTCATGGGCGACA
 GAAGGATATCAAAGTAGTGGAAGTTCTAACGTAACAGTGTGGGTAA

La parte que codifica la parte madura de la enzima tipo silvestre se puede expresar intracelularmente en *E. coli* por métodos conocidos para las personas versadas en el campo de biología molecular. Por ejemplo:

1. Generar una copia de la parte en mayúsculas del gen arriba descrito mediante el uso de la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR) (*Polymerase Chain Reaction*) con una enzima de restricción NdeI agregada (CATATG) antes de la GCTAGCACA y el sitio de restricción HindIII agregada (AAGCTT) después de GCTAGCACA.
2. Insertar la copia modificada resultante del gen mediante el uso de las enzimas arriba mencionadas en el vector de expresión pET24a(+), el cual se puede obtener de Novagen Inc. 601 Science Drive, Madison, WI 53711, USA.
3. Transformar en una cepa adecuada de *E. coli* y expresión por fermentación tal como lo describe el proveedor de pET24a(+).

Nuestra enzima mutante D11F se puede obtener usando el kit de mutagenesis "Quick Exchange" según el fabricante y usando la anterior construcción de la xilanasa *Bacillus subtilis* tipo silvestre- pET24a(+) y los siguientes ^{primers} primeros de mutagenesis PCR:

Primero de sentido

CTACTGGCAAAATTGGACTTTTGGAGGAGGTATAGTAAACGCTG

Primero de antisentido

CAGCGTTTACTATACCTCCTCCAAAAGTCCAATTTTGCCAGTAG

La enzima mutante se expresa y purifica usando los mismos protocolos que para la enzima tipo silvestre.

Ejemplo 4 – Estudios de inhibición de mutantes de xilanasa

Se fermentaron y purificaron los mutantes de xilanasa expresados en *E. coli* (ver Ejemplo 3) (es decir que no había ninguna otra actividad xilanótica presente en la preparación purificada) usando un paso de desalación y un paso de cromatografía de intercambio de cationes.

Estas preparaciones mutantes de xilanasa pura se diluyeron en 12 TXU/ml usando 0,1 M de ácido cítrico – 0,2 M de *-di*-fosfato de hidrógeno sódico, pH 5,0 y se usó en el siguiente ensayo.

Se hizo una preparación estable del inhibidor de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 1. Esta preparación se usó como patrón para todos los estudios de xilanasa-inhibidor xilanasa. Usando el método de cuantificación del inhibidor que se describe en el Ejemplo 1, se analizó la preparación del inhibidor para contener 126 XIU/ml.

Ensayo

A preparaciones mutantes de 250 μ l de xilanasa diluida se agregaron 0, 10, 25, 50 o 100 μ l de preparación del inhibidor, respectivamente. A estas mezclas xilanasa-inhibidor se agregó 0,1 M de ácido cítrico – 0,2 M de *-di*-fosfato de hidrógeno sódico, pH 5,0 haciendo el volumen final de 100 μ l. Estas mezclas de reacción se preincubaron durante 5 minutos a 40°C. En seguida a todas las mezclas inhibidor-xilanasa se agregó una tableta de xilazima (Megazyme, Irlanda). Luego de 10 minutos de incubación a 40°C, se terminaron las reacciones agregando 10ml de Tris/NaOH, al 2%, pH 12,0. Las mezclas se centrifugaron y el color azul que soltó del sustrato se midió a 590nm.

La Tabla 10 presenta los resultados.

Tabla 10. Inhibición relativa de mutantes de xilanasa y xilanasa primaria (enzima del tipo silvestre) como una función del inhibidor de xilanasa.

ID Mutante	0	1,26	3,15	6,3	12,6
			% inhibición relativa		
Tipo silvestre	100	77	48	29	23
D11Y	100	120	114	126	124
D11N	100	93	72	53	32
D11F	100	114	119	116	115
D11K	100	109	112	113	116
D11S	100	98	81	60	38
D11W	100	101	88	70	50
G34D	100	94	83	70	53

G34F	100	76	53	34	29
G34T	100	99	99	93	86
Y113A	100	96	80	62	43
Y113D	100	96	81	63	45
Y113K	100	103	85	63	47
N114A	100	80	49	28	22
N114D	100	84	57	39	29
N114F	100	84	54	39	34
N114K	100	87	56	33	24
D121N	100	80	36	16	14
D121K	100	104	95	85	75
D121F	100	101	89	72	60
D121A	100	81	50	27	21
R122D	100	85	59	41	28
R122F	100	93	74	58	58
R122A	100	78	46	33	26
Q175E	100	87	59	40	31
Q175S	100	88	59	30	19
Q175L	100	78	42	25	23
G12F	100	110	106	100	92
G13F	100	94	95	87	84
I15K	100	84	47	28	23
N32K	100	82	42	19	14
G120K	100	85	52	29	22
G120D	100	84	47	24	18
G120F	100	71	35	18	15
G120Y	100	81	40	18	16
G120N	100	84	49	29	23
D119K	100	94	67	40	26
D119Y	100	87	50	28	22
D119N	100	91	74	44	22
T123K	100	80	46	30	25
T123Y	100	80	47	28	27
T123D	100	83	36	20	17
T124K	100	110	92	73	57
T124Y	100	101	76	49	33
T124D	100	87	52	32	25
N17K	100	88	48	31	26
N17Y	100	79	42	23	19
N17D	100	90	81	50	22
N29K	100	83	50	30	23
N29Y	100	85	49	30	24
N29D	100	74	44	26	20
S31K	100	77	42	23	23
S31Y	100	83	50	27	22
S31D	100	79	52	30	24
D11F/R122D	100	109	111	110	109
D11F/G34D	100	104	106	103	104

De los resultados en la Tabla 10 se puede observar que los mutantes de xilanasa D11Y,
~~D11F, D11K, D11F/R122D y D11/G34D~~ son no-inhibidos por el inhibidor de xilanasa
endógena de trigo. Se esperaría que estos mutantes de xilanasa actúen de manera más

agresiva/específica en el arabinoxilan soluble en comparación con otros mutantes de xilanasa u otras xilanasas. Por lo tanto, serían superiores en aplicaciones donde se desea una disminución en viscosidad (como una función de arabinoxilan HMW).

Ejemplo 5 – Estudios de funcionalidad de los mutantes de xilanasa

Se fermentaron y purificaron los mutantes de xilanasa expresados en *E. coli* (ver Ejemplo 3) (es decir que no había ninguna otra actividad xilanótica presente en la preparación purificada).

Estas preparaciones mutantes de xilanasa pura se diluyeron en 400 TXU/ml usando agua y se usó el siguiente ensayo.

Ensayo

Se hizo una suspensión de 200 ml en harina 30% (peso por peso) usando agua (sometida a termostato a 25°C) agitando durante 5 minutos. 60,0 ml de esta suspensión se vaciaron en un vaso Ford y se midió el tiempo de drenaje de 50,0 ml. La medición es la medición del blanco. Se volvieron a verter los 60,0 de la suspensión de harina y a la suspensión se agregaron agitando, 1000µl de la preparación mutante de xilanasa diluida. Luego de 2, 5, 10 y 20 minutos se vertieron 60,0 ml en el vaso Ford y se gravó el tiempo de drenaje para 50,0 ml. Cada medición se hizo por triplicado.

La Tabla 11 muestra los resultados.

Tabla 11. Viscosidad relativa de suspensión de harina como una función de xilanasa mutante y xilanasa primaria (xilanasa tipo silvestre).

Mutante ID	Tiempo de incubación, minutos				
	0	2	5	10	20
		%, Inhibición relativa			
Tipo silvestre	100	112	120	131	141
D11Y	100	97	93	83	75
D11N	100	112	125	130	136
D11F	100	93	87	78	69
D11K	100	105	95	88	78
D11S	100	102	110	113	117
D11W	100	106	115	121	122
G34D	100	110	120	128	124
G34F	100	111	126	128	146
G34T	100	100	108	111	106
Y113A	100	118	129	130	124
Y113D	100	116	127	124	114
Y113K	100	118	123	121	115

27
45

N114A	100	115	128	127	131
N114D	100	125	144	162	170
N114F	100	113	119	131	150
N114K	100	119	129	141	147
D121N	100	104	103	106	104
D121K	100	122	132	141	162
D121F	100	107	117	128	147
D121A	100	101	102	103	107
R122D	100	120	119	124	115
R122F	100	127	144	150	160
R122A	100	123	138	144	153
Q175E	100	116	134	142	149
Q175S	100	110	113	121	129
Q175L	100	111	111	119	126
G12F	100	127	132	122	101
G13F	100	106	119	124	113
I15K	100	109	108	113	118
N32K	100	97	98	101	101
G120K	100	103	111	115	121
G120D	100	112	122	120	126
G120F	100	103	111	117	130
G120Y	100	106	106	108	126
G120N	100	119	123	130	141
D119K	100	118	119	127	125
D119Y	100	102	102	111	110
D119N	100	126	137	145	146
T123K	100	106	109	121	120
T123Y	100	101	106	108	116
T123D	100	113	123	125	126
T124K	100	117	131	128	127
T124Y	100	112	123	132	135
T124D	100	103	110	111	118
N17K	100	114	119	119	132
N17Y	100	102	102	108	108
N17D	100	120	131	135	143
N29K	100	98	100	100	104
N29Y	100	115	117	132	143
N29D	100	104	104	113	111
S31K	100	119	115	124	134
S31Y	100	110	118	122	137
S31D	100	99	103	109	110
D11F/R122D	100	91	89	82	77
D11F/G34D	100	96	93	84	80

Ejemplo 6 Mutación dirigida en sitio del sitio activo de xilanasa A *Bacillus subtilis*, no tiene influencia en la interacción de xilanasa:inhibidor de xilanasa

Se alteró mediante mutación dirigida en sitio un residuo en el sitio activo de la enzima de xilanasa A *Bacillus subtilis* tipo silvestre (ver Ejemplo 3). En el residuo mutado (Y166F) se perdió un enlace potencial de hidrógeno. La xilanasa mutante se expresó en *E. coli* se

fermentó y se purificó. En seguida, se investigó la interacción del mutante con el inhibidor de xilanasa (ver Ejemplo 4).

Como puede observarse de la Tabla 12 abajo, sorprendentemente, el intercambio de un amino ácido en el sitio activo no tuvo ningún efecto en las interacciones con el inhibidor de xilanasa en comparación con la enzima de xilanasa *Bacillus subtilis* tipo silvestre.

Tabla 12. Inhibición relativa de la xilanasa *Bacillus subtilis* tipo silvestre y el mutante de xilanasa Y166F.

			XIU/ml		
ID xilanasa	0	1,26	3,15	6,3	12,6
			% Inhibición relativa		
Tipo silvestre	100	75	40	24	20
Y166F	100	74	39	22	20

Por ello, en resumen, el experimento arriba descrito muestra una mutación dirigida en el sitio en el sitio activo de la xilanasa *Bacillus subtilis*, la cual no influencia las interacciones de xilanasa con el inhibidor de xilanasa.

Ejemplo 7. Mutación dirigida en sitio en xilanasas de la familia 11 aparte de xilanasa A *Bacillus subtilis*, que tiene influencia en las interacciones xilanasa-inhibidor xilanasa.

El residuo D19 de la enzima de xilanasa A *Thermomyces lanuginosus* se mutó a F19 por mutagenesis dirigida en sitio. D19 corresponde al residuo D11 en la xilanasa *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO. 1). El gen xilanasa A *Thermomyces lanuginosus* se describe como SEQ ID NO. 9

Los primeros para construcción del mutante D19F pueden ser los siguientes:

Primer de sentido

GGTTATTACTATTTCCTGGTGGAGTTTTGGAGGAGCGCAGGCCACG

Primer de antisentido

CGTGGCCTGCGCTCCTCCAAACTCCACCAGGAATAGTAATAACC

La xilanasa mutante que se obtuvo (F19F) se expresó en *E. coli*, se fermentó y se purificó. En seguida, se investigó la interacción del mutante y de la xilanasa A *Thermomyces lanuginosus* tipo silvestre con el inhibidor de xilanasa (ver Ejemplo 4). Como puede observarse de los resultados en la Tabla 13, el mutante D19F de la xilanasa A *Thermomyces*

lanuginosus se inhibió considerablemente menos por el inhibidor de xilanasa en comparación con la xilanasa A *Thermomyces lanuginosus* tipo silvestre.

46
47

Tabla 13. Inhibición relativa de la xilanasa A *Thermomyces lanuginosus* tipo silvestre (TLX) y la xilanasa mutante *Thermomyces lanuginosus*, D19F (D19F).

			XIU/ml		
ID xilanasa	0	1,26	3,15	6,3	12,6
			%, Inhibición relativa		
TLX	100	45	24	17	14
D19F	100	73	38	24	20

Por ello, en resumen, el experimento arriba descrito muestra una mutación dirigida en sitio en la xilanasa A *Thermomyces lanuginosus*. Los resultados muestran que una mutación que introduce una sustitución de un aminoácido en la superficie de la molécula de xilanasa (análoga a D11F en *B. subtilis*) cambia las interacciones xilanasa:inhibidor xilanasa. Por ello, nuestra invención (es decir, que los residuos superficiales controlan el nivel de inhibición de la xilanasa), es válida para xilanasas homólogas a la xilanasa *B. subtilis*.

RESUMEN

En resumen, la presente invención provee un medio para alterar la sensibilidad de una enzima de xilanasa a un inhibidor de xilanasa.

Todas las publicaciones mencionadas en la anterior descripción se incorporan en este contexto por referencia. Para la persona versada en la técnica serán aparentes varias modificaciones y variaciones de los métodos y sistema descritos en la presente invención sin salirse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque esta invención se ha descrito con respecto a realizaciones preferidas, debe entenderse que la invención tal como se reivindica, no debe limitarse indebidamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, la intención es que dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones se puedan hacer varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para las personas conocedoras de la bioquímica y biotecnología o campos relacionados.

NOTA: Sigue lista de referencias (bibliografía) que no se traduce

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, que comprende una o más modificaciones de aminoácido, de modo que el polipéptido o fragmento del mismo tenga una sensibilidad alterada frente a un inhibidor de xilanasa en comparación con la enzima de la xilanasa primaria.

2. Un polipéptido variante según la reivindicación 1, el cual se deriva de una xilanasa de la familia 11.

3. Un polipéptido de xilanasa variante o un fragmento de lo mismo, con actividad de xilanasa, según la reivindicación 1 ó 2, en donde dicha modificación de aminoácido es de uno o más residuos de amino ácidos superficiales.

4. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la modificación de aminoácido es de uno o más residuos accesibles solventes.

5. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde hay al menos dos de dichas modificaciones de aminoácido.

6. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha modificación de aminoácido es en cualquiera de uno o más de los residuos de aminoácidos:

Ala1-Trp6, Asn8, Thr10-Gly23, Asn25, Ser27, Asn29, Ser31-Asn32, Gly34, Thr43-Thr44, Ser46-Thr50, Asn52, Asn54, Gly56-Asn61, Asn63, Arg73-Leu76, Thr87-Arg89, Thr91-Lys95, Thr97, Lys99, Asp101-Gly102, Thr104, Thr109-Thr111, Tyr113-Asn114, Asp119-Thr124, Thr126, Gln133-Asn141, Thr143, Thr145, Thr147-Asn148, Asn151, Lys154-Gly157, Asn159-Leu160, Ser162-Trp164, Gln175, Ser177, Ser179, Asn181, Thr183, Trp185.

de la secuencia aminoácida *B. subtilis* que se muestra como SEQ ID No. 1 o su(s) posición(es) equivalente(s) en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

7. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha modificación de aminoácido es en cualquiera de uno o más números de residuos de aminoácido: 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 175 de la secuencia

aminoácida de *B. subtilis* que se muestra como la SEQ ID No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

49
48
da.

8. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, comprende además una o más modificaciones de aminoácidos en cualquiera de los demás residuos aminoácidos.

da

9. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, según la reivindicación 8, en donde dichos otros residuos de aminoácidos son cualquiera de uno o más números de residuos de aminoácidos: 3, 4, 5, 6, 7, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 108, 109, 110, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 179, 180, 181, 182, 183 de la secuencia de aminoácido *B. subtilis* que se muestra como la SEQ ID No.1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

da.

10. Un polipéptido de xilanasa variante, o un fragmento de lo mismo con actividad de xilanasa, según la reivindicación 8, en donde dichos otros residuos de aminoácido superficial son cualquiera de uno o más números de residuos de aminoácidos: 1, 2, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 184, 185 de la secuencia de aminoácidos *B. subtilis* que se muestra como la SEQ I.D. No. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homóloga.

da

11. Un polipéptido variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inhibidor es un inhibidor que se encuentra naturalmente en tejidos vegetales.

da? result
cual.

12. Un polipéptido variante según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se reduce la sensibilidad al inhibidor.

13. Un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasa frente a un inhibidor, cuyo método comprende modificar uno o más residuos aminoácidos de dicha enzima de manera que el polipéptido o un fragmento del mismo tenga una sensibilidad alterada a un inhibidor de xilanasa en comparación con la enzima de xilanasa primaria.

da
syde
etapas

14. Un método según la reivindicación 13, en donde dicho polipéptido variante es el que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

15. Un método según la reivindicación 13 ó 14, en donde se reduce la sensibilidad.

16. Una composición que comprende un polipéptido variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

17. Un método para degradar o modificar una pared de célula vegetal, cuyo método consiste en contactar dicha pared de célula vegetal con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una composición según la reivindicación 16.

18. Un método para procesar un material vegetal, el cual consiste en contactar dicho material vegetal con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o una composición según la reivindicación 16:

19. Una secuencia nucleótida que codifica un polipéptido variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

20. Una construcción que comprende la secuencia nucleótida según la reivindicación 19.

21. El uso de un polipéptido variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en un método de modificar materiales vegetales.

22. El uso de un polipéptido variante según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 en cualquiera o más procesos de: horneado, procesamiento de cereales, producción de almidón, procesamiento de pulpa, realzando la decoloración de la pulpa de madera.

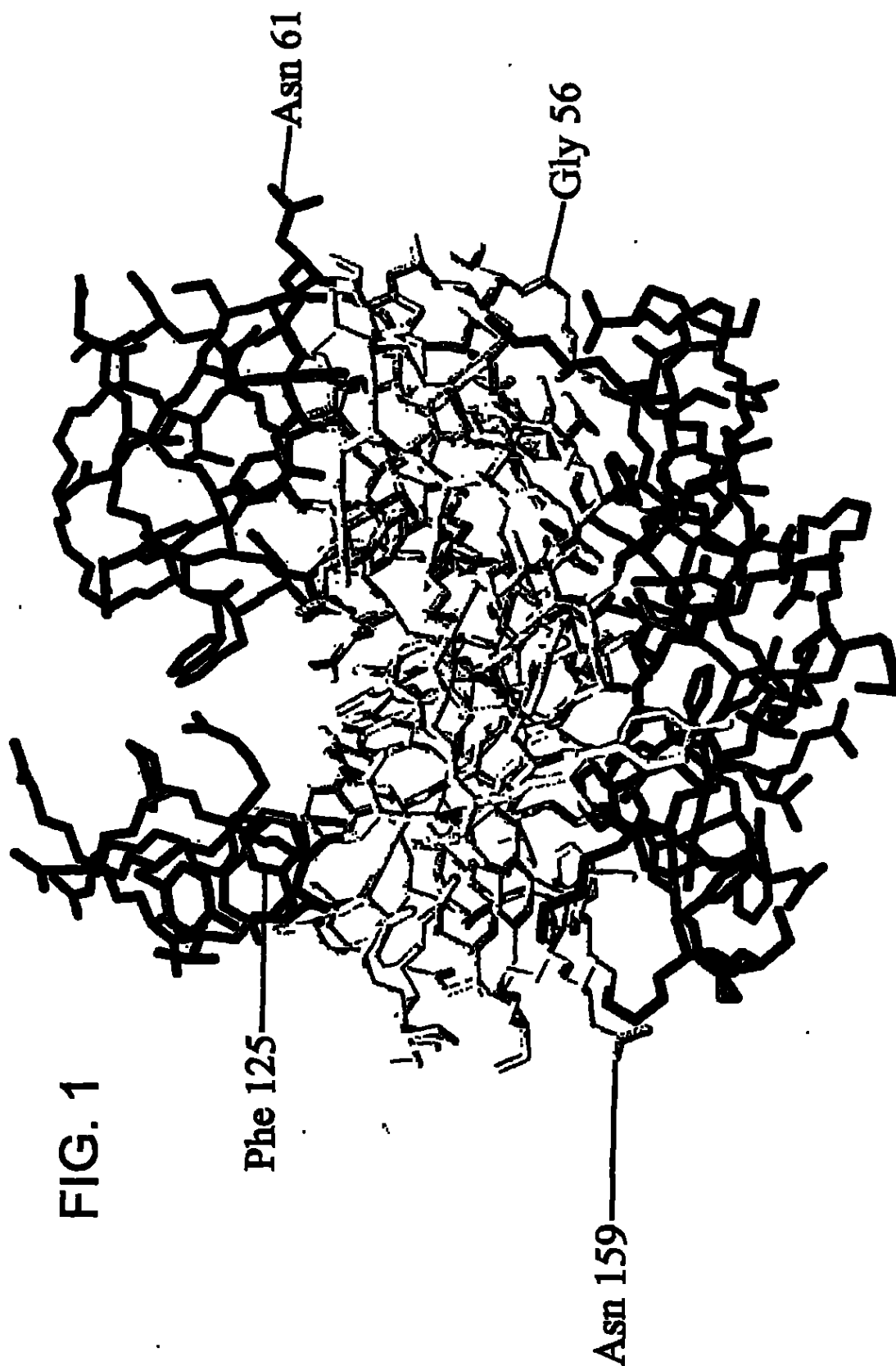


FIG. 1

FIG. 2

	1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
B. subtilis xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. clausenii xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. stearothermophilus xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. cerevisiae xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. catenula xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. burgundy xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. pidi xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. communis xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. lundbergii xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. catenula xyl2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. catenula xyl3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. insculpta xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
M. grisea xyl12	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. gracilis xyl2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T. reesei, xyl2(2)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T. reesei, xyl2(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T. reesei xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T. harzianum xylD	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T. viridis xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. gracilis xyl2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. niger xyl2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Penicillium sp 40 xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Streptomyces sp xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Streptomyces sp xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. thermosaccharovorans xylB	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. viridosporus xylA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T. fusca xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. pedunculatus xyl1A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. ocyria xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. purpurea xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. mixtus xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. fluorescens cellulosus xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. coalescens xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. kawachi xylC	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. niger xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A. tobiensis xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. purpureus xylB	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Cryptococcus sp 8-2 xyl-C82	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T. reesei xyl2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. fusidius xylA(1)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. fusidius xylA(2)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. acetoxylicum xylB	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
C. thermophilum xylB	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Basillus sp 414-1 xyl1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. multivariatum xylA	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. multivariatum xyl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. albus xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Caldicellulosigranulatus sp xylD	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D. thermophilum xylB	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
B. flavofaciens xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P. stipitatus xyla	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

[illegible]

FIG. 2CONT'D

B. subtilis xylA
B. circulans xylA
B. stearothermophilus xylA
A. caviae xylA
C. carbonum xyl1
E. turcica xyl1
A. pisi xyl
S. commune xylA
T. longioratus xylA
C. carbonum xyl2
C. sativus xyl2
E. insolens xyl1
M. grisea xyl22
C. gracile cpxA
T. reesei xyl2(2)
T. reesei, AAD2721 xyl2
T. reesei xyl1
T. harzianus xylD
T. viridis xyl
C. gracile cpxB
A. niger xyl2
Penicillium sp 40 xylA
Streptomyces sp xyl
Streptomyces sp xyl1
S. thermocyanosporolens xylB
S. viridoporus T7A sv2A
T. fusca xyl
C. pachnodae xyl1A
A. caryae xylA
C. purpurea xyl1
C. nictus xyl
S. fluorescentis cellulosa xyl
S. cochlariinae xyl
A. kawachi xylC
A. niger xyl1
A. tubigenalis xyl1
P. purpurogenum xylB
Cryptococcus sp 8-2 xyl-CB2
T. reesei xyl2
B. pumilus xylA(1)
B. pumilus xylA(2)
C. noctobutylicum xylB
C. thermocellum xylB
Bacillus sp 418-1 xyl2
P. multivesiculatus xylA
P. multivesiculatus xyl
A. albus xylA
Caldicellulosigraptor sp xylD
D. thermophilus xylB
A. flavofaciens xylA
P. stipitilis xylA

271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360	213
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	213
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	213
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	211
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	211
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	221
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	227
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	227
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	201
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	225
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	231
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	231
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	227
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	233
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	219
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	223
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	223
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	222
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	190
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	223
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	241
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	225
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	221
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	240
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	228
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	292
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	286
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	293
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	293
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	221
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	216
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	290
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	292
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	217
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	192
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	211
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	210
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	208
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	209
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	229
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	227
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	228
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	261
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	277
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	268
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	217
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	175
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	303
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	274
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	273
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	255
SENATQVAVASGKQ	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	SGSNTVTV	328

ff
8

¹
SEQUENCE LISTINGS

The amino acid sequence of the mature *Bacillus subtilis* xylanase (SEQ ID. No. 1).

5 1 10 11 20 21 30 31 40 41 50 51 60
ASTDYWQNW T DGGGIVNAVN GSGGNYSVNW SNTGNFVVGK GWTTGSPFRT INYNAGVWAP

61 70 71 80 81 90 91 100 101 110 111 120
10 NGNGYLTLYG WTRSPLIEYY VVDSWGTYRP TGTYKGT VKS DG G TYDIYTT TRY NAPSIDG

121 130 131 140 141 150 151 160 161 170 171 180
DRTTFTQYWS VRQSKRPTGS NATITFSNHV NAWKSHGMNL GSNWAYQVMA TEGYQSSGSS

181
15 NVT VW

Amino acid sequences derived from wheat flour xylanase inhibitor

A chain of inhibitor

20
N-terminal:
GAPVARAVEAVAPFGVCYDTKTLGNNLGGYAVPNV (35aa) SEQ ID NO. 2

C-terminal:

25 KRLGFSRLPHFTGCGGL (17aa) SEQ ID NO. 3

B chain of inhibitor

N-terminal:

30 LPVPAPVTKDPATSLYTIPFH (21aa) SEQ ID NO. 4

Lys-C digested B Chain:

LLASLPRGSTGVAGLANSGLALPAQVASAQK (31aa) SEQ ID NO. 5
35 GGSPAHYISARFIEVGDTRVPSVE (24aa) SEQ ID NO. 6
VNVGVLAACAPSK (13aa) SEQ ID NO. 7
VANRFLCLPTGGPGVAIFGGGPVPWPQFTQSMPYTLVVVK SEQ ID NO. 8

57
57

Thermomyces lanuginosus xylanase A gene (SEQ ID NO. 9)

1	10	11	20	21	30	31	40	41	50	51	60
ATGCAGACAA	CCCCCAACTC	GGAGGGCTGG	CACGATGGTT	ATTACTATTC	CTGGTGGAGT						

5

61	70	71	80	81	90	91	100	101	110	111	120
GACGGTGGAG	CGCAGGCCAC	GTACACCAAC	CTGGAAGGCG	GCACCTACGA	GATCAGCTGG						

121	130	131	140	141	150	151	160	161	170	171	180
GGAGATGGCG	GTAACCTCGT	CGGTGGAAAG	GGCTGGAACC	CCGGCCTGAA	CGCAAGAGCC						

10

181	190	191	200	201	210	211	220	221	230	231	240
ATCCACTTTG	AGGGTGTTTA	CCAGCCAAAC	GGCAACAGCT	ACCTTGCGGT	CTACGGTTGG						

15

241	250	251	260	261	270	271	280	281	290	291	300
ACCCGCAACC	CGCTGGTCGA	GTATTACATC	GTCGAGAACT	TTGGCACCTA	TGATCCTTCC						

301	310	311	320	321	330	331	340	341	350	351	360
TCCGGTGCTA	CCGATCTAGG	AACTGTCGAG	TGCGACGGTA	GCATCTATCG	ACTCGGCAAG						

20

361	370	371	380	381	390	391	400	401	410	411	420
ACCACTCGCG	TCAACGCACC	TAGCATCGAC	GGCACCCAAA	CCTTCGACCA	ATACTGGTCG						

421	430	431	440	441	450	451	460	461	470	471	480
GTCCGCCAGG	ACAAGCGCAC	CAGCGGTACC	GTCCAGACGG	GCTGCCACTT	CGACGCCTGG						

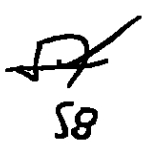
25

481	490	491	500	501	510	511	520	521	530	531	540
GCTCGCGCTG	GTTTGAATGT	CAACGGTGAC	CACTACTACC	AGATCGTTGC	AACGGAGGGC						

30

541	550	551	560	561	570	571	580	581	588		
TACTTCAGCA	GCGGCTATGC	TCGCATCACC	GTTGCTGACG	TGGGCTAA							

SEQUENCE LISTING



<110> Danisco A/S
Sibbesen, Ole
Sorensen, Jens

<120> Enzyme

<130> p8526wo

<140> PCT/IB01/00426

<141> 2001-03-08

<150> GB 0005585.5

<151> 2000-03-08

<150> GB 0015751.1

<151> 2000-06-27

<160> 66

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 185

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis.

<400> 1

Ala Ser Thr Asp Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val
1 5 10 15

Asn Ala Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn
20 25 30

Thr Gly Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe
35 40 45

Arg Thr Ile Asn Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly
50 55 60

Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr
65 70 75 80

Val Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly
85 90 95

Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg
100 105 110

Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr
115 120 125

Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile
130 135 140

Thr Phe Ser Asn His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu
145 150 155 160

Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser

165

170

175

58
59

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
180 185

<210> 2
<211> 35
<212> PRT
<213> wheat

<400> 2

Gly Ala Pro Val Ala Arg Ala Val Glu Ala Val Ala Pro Phe Gly Val
1 5 10 15

Cys Tyr Asp Thr Lys Thr Leu Gly Asn Asn Leu Gly Gly Tyr Ala Val
20 25 30

Pro Asn Val
35

<210> 3
<211> 17
<212> PRT
<213> Wheat

<400> 3

Lys Arg Leu Gly Phe Ser Arg Leu Pro His Phe Thr Gly Cys Gly Gly
1 5 10 15

Leu

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Wheat

<400> 4

Leu Pro Val Pro Ala Pro Val Thr Lys Asp Pro Ala Thr Ser Leu Tyr
1 5 10 15

Thr Ile Pro Phe His
20

<210> 5
<211> 31
<212> PRT
<213> Wheat

<400> 5

Leu Leu Ala Ser Leu Pro Arg Gly Ser Thr Gly Val Ala Gly Leu Ala
1 5 10 15

Asn Ser Gly Leu Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Ser Ala Gln Lys
20 25 30

<210> 6

59
60

<211> 24
<212> PRT
<213> Wheat

<400> 6

Gly Gly Ser Pro Ala His Tyr Ile Ser Ala Arg Phe Ile Glu Val Gly
1 5 10 15

Asp Thr Arg Val Pro Ser Val Glu
20

<210> 7
<211> 13
<212> PRT
<213> Wheat

<400> 7

Val Asn Val Gly Val Leu Ala Ala Cys Ala Pro Ser Lys
1 5 10

<210> 8
<211> 41
<212> PRT
<213> Wheat

<400> 8

Val Ala Asn Arg Phe Leu Leu Cys Leu Pro Thr Gly Gly Pro Gly Val
1 5 10 15

Ala Ile Phe Gly Gly Gly Pro Val Pro Trp Pro Gln Phe Thr Gln Ser
20 25 30

Met Pro Tyr Thr Leu Val Val Val Lys
35 40

<210> 9
<211> 588
<212> DNA
<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 9

atgcagacaa cccccaactc ggagggctgg cacgatgggtt attactattc ctggtggagt 60
gacggtggag cgcaggccac gtacaccaac ctggaaggcg gcacctacga gatcagctgg 120
ggagatggcg gtaacctcgt cgggtgaaag ggctggaacc ccggcctgaa cgcaagagcc 180
atccactttg aggggtgttta ccagccaaac ggcaacagct accttgcggt ctacggttgg 240
accgcgaacc cgctggtcga gtattacatc gtcgagaact ttggcaccta tgatccttcc 300
tccggtgcta ccgatctagg aactgtcgag tgcgacggta gcatctatcg actcggcaag 360
accactcgcg tcaacgcacc tagcatcgac ggcacccaaa ccttcgacca atactggtcg 420
gtccgccagg acaagcgcac cagcgggtacc gtccagacgg gctgccactt cgacgcctgg 480
gctcgcgctg gtttgaatgt caacgggtgac cactactacc agatcgttgc aacggagggc 540

tacttcagca gcggtatgc tcgcatcacc gttgctgacg tgggctaa

588

66
61

<210> 10
<211> 645
<212> DNA
<213> *Bacillus subtilis*

<400> 10
catatgttta agtttaaaaa gaatttctta gttggattat cggcagcttt aatgagtatt 60
agcttgtttt cggcaccgc ctctgcagct agcacagact actggcaaaa ttggactgat 120
gggggcggtg tagtaaacgc tgtcaatggg tctggcggga attacagtgt taattggtct 180
aataccggaa attttgttgt tggtaaaggt tggactacag gttcgccatt taggacgata 240
aactataatg ccggagtttg ggcgccgaat ggcaatggat atttaacttt atatggttgg 300
acgagatcac ctctcataga atattatgta gtggattcat ggggtactta tagacctact 360
ggaacgtata aaggtactgt aaaaagtgat ggggtacat atgacatata tacaactaca 420
cgttataacg caccttccat tgatggcgat cgcactactt ttacgcagta ctggagtgtt 480
cgccagtcga agagaccaac cggaagcaac gctacaatca ctttcagcaa tcatgtgaac 540
gcatggaaga gccatggaat gaatctgggc agtaattggg ctraccaagt catggcgaca 600
gaaggatatc aaagtagtgg aagttctaac gtaacagtgt ggtaa 645

<210> 11
<211> 657
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: *B. subtilis* xylanase A sequence with added restriction site

<400> 11
catatgttta agtttaaaaa gaatttctta gttggattat cggcagcttt aatgagtatt 60
agcttgtttt cggcaaccgc ctctgcacat atggctagca cagactactg gcaaaattgg 120
actgatgggg gcggtatagt aaacgctgtc aatgggtctg gcgggaatta cagtgttaat 180
tggtctaata ccggaatttt tgttggttgt aaaggttgga ctacaggttc gccatttagg 240
acgataaact ataatgccgg agtttgggcg ccgaatggca atggatatat aactttatat 300
ggttggacga gatcacctct catagaatat tatgtagtgg attcatgggg tacttataga 360
cctactggaa cgtataaagg tactgtaaaa agtgatgggg gtacatatga catatataca 420
actacacgtt ataacgcacc ttccattgat ggcgacgca ctacttttac gcagtactgg 480
agtgttcgcc agtcgaagag accaaccgga agcaacgcta caatcacttt cagcaatcat 540

gtgaacgcat ggaagagcca tggaatgaat ctgggcagta attgggctta ccaagtcatg 600
gcgacagaag gatatcaaag tagtggaagt tctaacgtaa cagtgtggta aaagctt 657

61
62

<210> 12
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial sequence: sense primer

<400> 12
ctactggcaa aattggactt ttggaggagg tataagtaaac gctg 44

<210> 13
<211> 44
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Antisense primer

<400> 13
cagcgtttac tatacctcct ccaaaagtcc aattttgcca gtag 44

<210> 14
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Sense primer

<400> 14
ggttattact attcctgggtg gagttttgga ggagcgcagg ccacg 45

<210> 15
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Antisense primer

<400> 15
cgtggcctgc gctcctccaa aactccacca ggaatagtaa taacc 45

<210> 16
<211> 213
<212> PRT
<213> Bacillus subtilis

<400> 16

Met Phe Lys Phe Lys Lys Asn Phe Leu Val Gly Leu Ser Ala Ala Leu

67
63

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

<210> 17
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Bacillus circulans

<400> 17

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

63
64

65		70		75		80
Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu						
	85			90		95
Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser						
	100			105		110
Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Lys Ser						
	115			120		125
Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro						
	130			135		140
Ser Ile Asp Gly Asp Arg Thr Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg						
	145			150		155
Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile Thr Phe Thr Asn						
	165			170		175
His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu Gly Ser Asn Trp						
	180			185		190
Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser						
	195			200		205
Asn Val Thr Val Trp						
	210					
<210> 18						
<211> 211						
<212> PRT						
<213> Bacillus stearothermophilus						
<400> 18						
Met Lys Leu Lys Lys Lys Met Leu Thr Leu Leu Leu Thr Ala Ser Met						
1		5		10		15
Ser Phe Gly Leu Phe Gly Ala Thr Ser Ser Ala Ala Thr Asp Tyr Trp						
	20			25		30
Gln Tyr Trp Thr Asp Gly Gly Gly Met Val Asn Ala Val Asn Gly Pro						
	35			40		45
Gly Gly Asn Tyr Ser Val Thr Trp Gln Asn Thr Gly Asn Phe Val Val						
	50			55		60
Gly Lys Gly Trp Thr Val Gly Ser Pro Asn Arg Val Ile Asn Tyr Asn						
65		70		75		80
Ala Gly Ile Trp Glu Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly						
	85			90		95
Trp Thr Arg Asn Ala Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp Gly						
	100			105		110
Thr Tyr Arg Ala Thr Gly Asn Tyr Glu Ser Gly Thr Val Asn Ser Asp						
	115			120		125
Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn Ala Pro Ser						

64
65

130 135 140

Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Val Ser Ile Thr Phe Ser Asn His Val
165 170 175

Asn Ala Trp Arg Ser Lys Gly Met Asn Leu Gly Ser Ser Trp Ala Tyr
180 185 190

Gln Val Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Arg Ser Asn Val
195 200 205

Thr Val Trp
210

<210> 19
<211> 211
<212> PRT
<213> A. caviae

<400> 19

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

Met Ser Phe Gly Val Phe Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ala Thr Asp Tyr
20 25 30

Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Val Asn Gly
35 40 45

Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Ser Trp Gln Asn Thr Gly Asn Phe Val
50 55 60

Val Gly Lys Gly Trp Thr Tyr Gly Thr Pro Asn Arg Val Val Asn Tyr
65 70 75 80

Asn Ala Gly Val Phe Ala Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Phe Tyr
85 90 95

Gly Trp Thr Arg Asn Ala Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Asn Ser Asp
115 120 125

Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn Ala Pro Ser
130 135 140

Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Pro Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser
145 150 155 160

Lys Arg Pro Thr Gly Val Asn Ser Thr Ile Thr Phe Ser Asn His Val
165 170 175

Asn Ala Trp Pro Ser Lys Gly Met Tyr Leu Gly Asn Ser Trp Ser Tyr
180 185 190

Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Asn Ala Asn Val

65
66

195 200 205

Thr Val Trp
210

<210> 20
<211> 221
<212> PRT
<213> C. carbonum

<400> 20

Met Val Ser Phe Thr Ser Ile Ile Thr Ala Ala Val Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Ala Thr Asp Val Ser Leu Val Ala Arg Gln Asn
20 25 30

Thr Pro Asn Gly Glu Gly Thr His Asn Gly Cys Phe Trp Ser Trp Trp
35 40 45

Ser Asp Gly Gly Ala Arg Ala Thr Tyr Thr Asn Gly Ala Gly Gly Ser
50 55 60

Tyr Ser Val Ser Trp Gly Ser Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys Gly
65 70 75 80

Trp Asn Pro Gly Thr Ala Arg Thr Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Tyr Asn
85 90 95

Tyr Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro
100 105 110

Leu Val Glu Tyr Tyr Val Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asp Pro Ser
115 120 125

Ser Gln Ser Gln Asn Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Ser Ser Tyr
130 135 140

Lys Ile Ala Gln Ser Thr Arg Thr Asn Gln Pro Ser Ile Asp Gly Thr
145 150 155 160

Arg Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asn Lys Arg Ser Ser
165 170 175

Gly Ser Val Asn Met Lys Thr His Phe Asp Ala Trp Ala Ser Lys Gly
180 185 190

Met Asn Leu Gly Gln His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr
195 200 205

Phe Ser Thr Gly Asn Ala Gln Ile Thr Val Asn Cys Pro
210 215 220

<210> 21
<211> 227
<212> PRT
<213> H. turcicum

<400> 21

66
63

Met Val Ser Phe Thr Ser Ile Ile Thr Ala Ala Val Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Ala Thr Asp Ile Ala Ala Arg Ala Pro Ser Asp
20 25 30

Leu Val Ala Arg Gln Ser Thr Pro Asn Gly Glu Gly Thr His Asn Gly
35 40 45

Cys Phe Tyr Ser Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Arg Ala Thr Tyr Thr
50 55 60

Asn Gly Ala Gly Gly Ser Tyr Ser Val Ser Trp Gly Thr Gly Gly Asn
65 70 75 80

Leu Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Thr Ala Arg Thr Ile Thr
85 90 95

Tyr Ser Gly Gln Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Ile Tyr
100 105 110

Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Val Val Glu Asn Phe
115 120 125

Gly Thr Tyr Asp Pro Ser Ser Gln Ala Gln Asn Lys Gly Thr Val Thr
130 135 140

Ser Asp Gly Ser Ser Tyr Lys Ile Ala Gln Ser Thr Arg Thr Asn Gln
145 150 155 160

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

Gln Asn Lys Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Met Lys Thr His Phe Asp
180 185 190

Ala Trp Ala Ser Lys Gly Met Asn Leu Gly Ser His Tyr Tyr Gln Ile
195 200 205

Val Ala Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val
210 215 220

Asn Cys Pro
225

<210> 22
<211> 227
<212> PRT
<213> A. pisi

<400> 22

Met Val Ser Phe Thr Ser Ile Phe Thr Ala Ala Val Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala Leu Ala Val Pro Val Thr Asp Leu Ala Thr Arg Ser Leu Gly Ala
20 25 30

Leu Thr Ala Arg Ala Gly Thr Pro Ser Ser Gln Gly Thr His Asn Gly
35 40 45

67
68

Cys Phe Tyr Ser Trp Trp Thr Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr
50 55 60

Asn Gly Ala Gly Gly Ser Tyr Ser Val Asn Trp Lys Thr Gly Gly Asn
65 70 75 80

Leu Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ala Ala Arg Thr Ile Thr
85 90 95

Tyr Ser Gly Thr Tyr Ser Pro Ser Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Glu Asn Phe
115 120 125

Gly Thr Tyr Asp Pro Ser Ser Gln Ala Thr Val Lys Gly Ser Val Thr
130 135 140

Ala Asp Gly Ser Ser Tyr Lys Ile Ala Gln Thr Gln Arg Thr Asn Gln
145 150 155 160

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

Gln Asn Lys Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Met Lys Thr His Phe Asp
180 185 190

Ala Trp Ala Ala Lys Gly Met Lys Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile
195 200 205

Val Ala Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Gln Ile Thr Val
210 215 220

Asn Cys Ala
225

<210> 23
<211> 201
<212> PRT
<213> S. commune

<400> 23

Ala Ala Ser Gly Thr Pro Ser Ser Thr Gly Thr Asp Gly Gly Tyr Tyr
1 5 10 15

Tyr Ser Trp Trp Thr Asp Gly Ala Gly Asp Ala Thr Tyr Gln Asn Asn
20 25 30

Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Trp Ser Gly Asn Asn Gly Asn Leu
35 40 45

Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ala Ala Ser Arg Ser Ile Ser
50 55 60

Tyr Ser Gly Thr Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr
65 70 75 80

Gly Trp Thr Arg Ser Ser Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr
85 90 95

68
69

Gly Ser Tyr Asp Pro Ser Ser Ala Ala Ser His Lys Gly Ser Val Thr
100 105 110

Cys Asn Gly Ala Thr Tyr Asp Ile Leu Ser Thr Trp Arg Tyr Asn Ala
115 120 125

Pro Ser Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Glu Gln Phe Trp Ser Val Arg
130 135 140

Asn Pro Lys Lys Ala Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Thr Val Asp Val
145 150 155 160

Gln Cys His Phe Asp Ala Trp Lys Gly Leu Gly Met Asn Leu Gly Ser
165 170 175

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

Thr Ala Thr Ile Thr Val Thr Ala Ser
195 200

<210> 24
<211> 225
<212> PRT
<213> T. lanuginosus

<400> 24

Met Val Gly Phe Thr Pro Val Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Pro Ala Gly Asn Ala Thr Glu Leu Glu Lys Arg Gln
20 25 30

Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser Trp
35 40 45

Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly Gly
50 55 60

Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys
65 70 75 80

Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe Glu Gly Val
85 90 95

Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg
100 105 110

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asp
115 120 125

Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly Ser
130 135 140

Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp
145 150 155 160

Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys Arg
165 170 175

69
70

Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
180 185 190

Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr
195 200 205

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp Val
210 215 220

Gly
225

<210> 25
<211> 231
<212> PRT
<213> C. carbonum

<400> 25

Met Val Ser Phe Lys Ser Leu Leu Leu Ala Ala Val Ala Thr Thr Ser
1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Pro Phe Asp Phe Leu Arg Glu Arg Asp Asp Val Asn
20 25 30

Ala Thr Ala Leu Leu Glu Lys Arg Gln Ser Thr Pro Ser Ala Glu Gly
35 40 45

Tyr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Trp Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser
50 55 60

Ala Gln Tyr Thr Met Gly Glu Gly Ser Arg Tyr Ser Val Thr Trp Arg
65 70 75 80

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

Arg Val Ile Asn Tyr Gly Gly Ala Phe Asn Pro Gln Gly Asn Gly Tyr
100 105 110

Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Val
115 120 125

Ile Glu Ser Tyr Gly Thr Tyr Asn Pro Ser Ser Gly Ala Gln Ile Lys
130 135 140

Gly Ser Phe Gln Thr Asp Gly Gly Thr Tyr Asn Val Ala Val Ser Thr
145 150 155 160

Arg Tyr Asn Gln Pro Ser Ile Asp Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln Tyr
165 170 175

Trp Ser Val Arg Thr Gln Lys Arg Val Gly Gly Ser Val Asn Met Gln
180 185 190

Asn His Phe Asn Ala Trp Ser Arg Tyr Gly Leu Asn Leu Gly Gln His
195 200 205

Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser
210 215 220

70
71

Asp Ile Tyr Val Gln Thr Gln
225 230

<210> 26
<211> 231
<212> PRT
<213> C. sativus

<400> 26

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

<210> 27
<211> 227
<212> PRT
<213> H. insolens

<400> 27

71
72

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

Gln Thr His
225

<210> 28
<211> 233
<212> PRT
<213> M. grisea

<400> 28

Met Val Ser Phe Thr Ser Ile Val Thr Ala Val Val Ala Leu Ala Gly
1 5 10 15
Ser Ala Leu Ala Ile Pro Ala Pro Asp Gly Asn Met Thr Gly Phe Pro
20 25 30
Phe Glu Gln Leu Met Arg Arg Gln Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Arg
35 40 45

72
73

His Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser Trp Trp Thr Asp Gly Ala Ser Pro Val
50 55 60

Gln Tyr Gln Asn Gly Asn Gly Gly Ser Tyr Ser Val Gln Trp Gln Ser
65 70 75 80

Gly Gly Asn Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Met Pro Gly Gly Ser Lys
85 90 95

Ser Ile Thr Tyr Ser Gly Thr Phe Asn Pro Val Asn Asn Gly Asn Ala
100 105 110

Tyr Leu Cys Ile Tyr Gly Trp Thr Gln Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
115 120 125

Ile Leu Glu Asn Tyr Gly Glu Tyr Asn Pro Gly Asn Ser Ala Gln Ser
130 135 140

Arg Gly Thr Leu Gln Ala Ala Gly Gly Thr Tyr Thr Leu His Glu Ser
145 150 155 160

Thr Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Gln Gln
165 170 175

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

Gly Glu Phe Phe Gln Ala Trp Glu Arg Ala Gly Met Arg Met Gly Asn
195 200 205

His Asn Tyr Met Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Arg Ser Ala Gly Asn
210 215 220

Ser Asn Ile Asn Val Gln Thr Pro Ala
225 230

<210> 29
<211> 219
<212> PRT
<213> C. gracile

<400> 29

Met Val Ser Phe Lys Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

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

Thr Pro Ser Gly Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Phe Trp
35 40 45

Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Tyr Gln Asn Gly Ala Gly Gly Ser
50 55 60

Tyr Ser Val Gln Trp Gln Asn Cys Gly Asn Phe Val Gly Gly Lys Gly
65 70 75 80

Trp Asn Pro Gly Ala Ala Arg Thr Ile Asn Phe Ser Gly Thr Phe Ser
85 90 95

73
74

Pro Gln Gly Asn Gly Tyr Leu Ala Ile Tyr Gly Trp Thr Gln Asn Pro
100 105 110

Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Phe Gly Thr Tyr Asp Pro Ser
115 120 125

Ser Gln Ala Ser Lys Phe Gly Thr Ile Gln Gln Asp Gly Ser Thr Tyr
130 135 140

Thr Ile Ala Lys Thr Thr Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Glu Gly Thr
145 150 155 160

Ser Thr Phe Asp Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Asn His Arg Ser Ser
165 170 175

Gly Ser Val Asn Val Ala Ala His Phe Asn Ala Trp Ala Gln Ala Gly
180 185 190

Leu Lys Leu Gly Ser His Asn Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr
195 200 205

Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Thr Val Ser
210 215

<210> 30
<211> 223
<212> PRT
<213> T. reesei

<400> 30

Met Val Ser Phe Thr Ser Leu Leu Ala Gly Val Ala Ala Ile Ser Gly
1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Val Glu Pro Val Ala Val Glu Lys
20 25 30

Arg Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe His
35 40 45

Ser Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro
50 55 60

Gly Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly
65 70 75 80

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

Gly Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp
100 105 110

Ser Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Gly Asn Phe Gly Thr
115 120 125

Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp
130 135 140

Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser
145 150 155 160

74
75

Ile Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn
165 170 175

His Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp
180 185 190

Ala Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala
195 200 205

Val Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
210 215 220

<210> 31
<211> 223
<212> PRT
<213> T. reesei

<400> 31

Met Val Ser Phe Thr Ser Leu Leu Ala Gly Val Ala Ala Ile Ser Gly
1 5 10 15

Val Leu Ala Ala Pro Ala Ala Glu Val Glu Ser Val Ala Val Glu Lys
20 25 30

Arg Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr
35 40 45

Ser Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro
50 55 60

Gly Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly
65 70 75 80

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

Gly Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp
100 105 110

Ser Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr
115 120 125

Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp
130 135 140

Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser
145 150 155 160

Ile Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn
165 170 175

His Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp
180 185 190

Ala Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala
195 200 205

Val Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
210 215 220

75
x

<210> 32
<211> 222
<212> PRT
<213> T. reesei

<400> 32

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

<210> 33
<211> 190
<212> PRT
<213> T. harzianum

<400> 33

Gln Thr Ile Gly Pro Gly Thr Gly Tyr Ser Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser
1 5 10 15
Tyr Trp Asn Asp Gly His Ala Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Gly Gly

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

```
<210> 34
<211> 223
<212> PRT
<213> T. viride
```

<400> 34

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

77
78

115	120	125
Tyr Asn Pro Ser Thr Gly Thr Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp 130 135 140		
Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser 145 150 155 160		
Ile Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn 165 170 175		
His Ala Pro Ala Ala Arg Ser Arg Leu Arg Thr Thr Ser Asn Ala Trp 180 185 190		
Arg Asn Leu Gly Leu Thr Leu Gly Thr Leu Asp Tyr Gln Ile Ile Ala 195 200 205		
Val Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Asn Ala Asn Ile Asn Val Ser 210 215 220		
<210> 35		
<211> 241		
<212> PRT		
<213> C. gracile		
<400> 35		
Met Val Asn Phe Ser Ser Leu Phe Leu Ala Ala Ser Ala Ala Val Val 1 5 10 15		
Ala Val Ala Ala Pro Gly Glu Leu Pro Gly Met His Lys Arg Gln Thr 20 25 30		
Leu Thr Ser Ser Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser Phe 35 40 45		
Trp Thr Asp Gly Gln Gly Asn Val Gln Tyr Thr Asn Glu Ala Gly Gly 50 55 60		
Gln Tyr Ser Val Thr Trp Ser Gly Asn Gly Asn Trp Val Gly Gly Lys 65 70 75 80		
Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Arg Thr Ile Asn Tyr Thr Ala Asn Tyr 85 90 95		
Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn 100 105 110		
Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asn Pro 115 120 125		
Ser Thr Gly Ala Thr Arg Leu Gly Ser Val Thr Thr Asp Gly Ser Cys 130 135 140		
Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Glu Gly 145 150 155 160		
Thr Ser Thr Phe Tyr Gln Phe Trp Ser Val Arg Gln Asn Lys Arg Ser 165 170 175		
Gly Gly Ser Val Asn Met Ala Ala His Phe Asn Ala Trp Ala Ala Ala		

78
79

180	185	190
Gly Leu Gln Leu Gly Thr His Asp Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly		
195	200	205
Tyr Tyr Ser Ser Gly Ser Ala Thr Val Asn Val Gly Ala Ser Ser Asp		
210	215	220
Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Gly Gly Gly Ser Thr Asn Val Ser		
225	230	235
		240
Phe		
<210> 36		
<211> 225		
<212> PRT		
<213> A. niger		
<400> 36		
Met Leu Thr Lys Asn Leu Leu Leu Cys Phe Ala Ala Ala Lys Ala Ala		
1	5	10
		15
Leu Ala Val Pro His Asp Ser Val Ala Gln Arg Ser Asp Ala Leu His		
20	25	30
Met Leu Ser Glu Arg Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Glu Asn Asn Gly		
35	40	45
Phe Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Asp Val Thr Tyr Thr		
50	55	60
Asn Gly Asp Ala Gly Ala Tyr Thr Val Glu Trp Ser Asn Val Gly Asn		
65	70	75
		80
Phe Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Gln Asp Ile Thr		
85	90	95
Tyr Ser Gly Thr Phe Thr Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ser Val Tyr		
100	105	110
Gly Trp Thr Thr Asp Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr		
115	120	125
Gly Asp Tyr Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr		
130	135	140
Ser Asp Gly Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Thr Asn Ala		
145	150	155
		160
Ala Ser Ile Gln Gly Thr Ala Thr Phe Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg		
165	170	175
Gln Asn Lys Arg Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn His Phe Asn		
180	185	190
Ala Trp Ala Lys Leu Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile		
195	200	205
Val Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ile Thr Val		

79
80

210

215

220

Gln
225

<210> 37
<211> 221
<212> PRT
<213> Penicillium sp 40

<400> 37

Met Lys Ser Phe Ile Ala Tyr Leu Leu Ala Ser Val Ala Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Met Ala Val Pro Gly Glu Tyr His Lys Arg His Asp Lys Arg Gln
20 25 30

Thr Ile Thr Ser Ser Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser
35 40 45

Phe Trp Thr Asn Gly Gly Gly Thr Val Gln Tyr Thr Asn Gly Ala Ala
50 55 60

Gly Glu Tyr Ser Val Thr Trp Glu Asn Cys Gly Asp Phe Thr Ser Gly
65 70 75 80

Lys Gly Trp Ser Thr Gly Ser Ala Arg Asp Ile Thr Phe Glu Gly Thr
85 90 95

Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Thr
100 105 110

Ser Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Leu Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn
115 120 125

Pro Gly Asn Ser Met Thr Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Ser
130 135 140

Val Tyr Asp Ile Tyr Glu His Gln Gln Val Asn Gln Pro Ser Ile Ser
145 150 155 160

Gly Thr Ala Thr Phe Asn Gln Tyr Trp Ser Ile Arg Gln Asn Thr Arg
165 170 175

Ser Ser Gly Thr Val Thr Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Lys
180 185 190

Leu Gly Met Asn Leu Gly Ser Phe Asn Tyr Gln Ile Val Ser Thr Glu
195 200 205

Gly Tyr Glu Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Val Ser
210 215 220

<210> 38
<211> 240
<212> PRT
<213> Streptomyces sp

<400> 38

80
81

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

<210> 39
<211> 228
<212> PRT
<213> Streptomyces sp

<400> 39

Met Thr Lys Asp Asn Thr Pro Ile Arg Pro Val Ser Arg Arg Gly Phe
1 5 10 15
Ile Gly Arg Ala Gly Ala Leu Ala Leu Ala Thr Ser Gly Leu Met Leu
20 25 30
Pro Gly Thr Ala Arg Ala Asp Thr Val Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly
35 40 45

81
82

Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser
50 55 60

Val Ser Met Asn Leu Ala Ser Gly Gly Ser Tyr Gly Thr Ser Trp Thr
65 70 75 80

Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly Trp Ala Asn Gly Ala Arg
85 90 95

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

Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Ala Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile
115 120 125

Val Asp Asn Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr
130 135 140

Val Thr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Val Tyr Gln Thr Thr Arg Val
145 150 155 160

Asn Ala Pro Ser Val Glu Gly Thr Lys Thr Phe Asn Gln Tyr Trp Ser
165 170 175

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

Phe Asp Ala Trp Ala Arg Tyr Gly Met Pro Leu Gly Ser Phe Asn Tyr
195 200 205

Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser
210 215 220

Ile Ser Val Ser
225

<210> 40
<211> 239
<212> PRT
<213> S. thermocyaneoviolaceus

<400> 40

Met Asn Thr Leu Val His Pro Gln Gly Arg Ala Gly Gly Leu Arg Leu
1 5 10 15

Leu Val Arg Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Met
20 25 30

Met Phe Gly Gly Thr Ala Arg Ala Asp Thr Ile Thr Ser Asn Gln Thr
35 40 45

Gly Thr His Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly
50 55 60

Thr Val Thr Met Asn Thr Gly Ala Gly Gly Asn Tyr Ser Thr Gln Trp
65 70 75 80

Ser Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly Trp Ala Thr Gly Gly
85 90 95

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

Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp Ser Gln Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
115 120 125

Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly
130 135 140

Thr Val Tyr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Met Thr Thr Arg
145 150 155 160

Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Lys Thr Phe Asn Gln Tyr Trp
165 170 175

Ser Val Arg Gln Asn Lys Arg Thr Gly Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn
180 185 190

His Phe Asp Ala Trp Ala Ala His Gly Met Pro Leu Gly Thr Phe Asn
195 200 205

Tyr Met Ile Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn
210 215 220

Ile Thr Val Gly Asp Ser Gly Gly Asp Asn Gly Gly Gly Gly Gly
225 230 235

<210> 41
<211> 242
<212> PRT
<213> S. viridosporus

<400> 41

Met Asn Ala Phe Ala His Pro Arg Gly Arg Arg His Gly Arg Ser Ala
1 5 10 15

Pro Met Ser Pro Arg Ser Thr Trp Ala Val Leu Leu Ala Ala Leu Ala
20 25 30

Val Met Leu Leu Pro Gly Thr Ala Thr Ala Ala Pro Val Ile Thr Thr
35 40 45

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

Ala Gln Gly Thr Val Ser Met Asp Leu Gly Ser Gly Gly Thr Tyr Ser
65 70 75 80

Thr Gln Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly Trp Ser
85 90 95

Thr Gly Gly Arg Lys Thr Val Asn Tyr Ser Gly Thr Phe Asn Pro Ser
100 105 110

Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Thr Gly Pro Leu Ile
115 120 125

Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Lys
130 135 140

Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys
145 150 155 160
Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Lys Thr Phe Asp
165 170 175
Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Gly Gly Thr Ile Thr
180 185 190
Ser Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Asn Gly Met Asn Leu Gly
195 200 205
Asn His Asn Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly
210 215 220
Ser Ser Thr Ile Thr Val Ser Glu Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly

<210> 42
<211> 240
<212> PRT
<213> T. fusca

<400> 42

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

84
85

Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Thr Ala Gly
180 185 190

Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg His Gly Met His Leu Gly Thr His
195 200 205

Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser
210 215 220

Asn Val Thr Leu Gly Thr Ser Gly Gly Gly Asn Pro Gly Gly Gly Asn
225 230 235 240

<210> 43
<211> 241
<212> PRT
<213> C. pachnodae

<400> 43

Met Thr Arg Thr Ile Ser Arg Ala Ala His Arg Pro Pro Ala Gly Gly
1 5 10 15

Arg Ile Ala Arg Ala Leu Ala Ala Ala Gly Ala Thr Val Ala Met Val
20 25 30

Ile Ala Gly Val Ala Ala Ala Gln Pro Ala Ala Ala Val Asp Ser Asn
35 40 45

Ser Thr Gly Ser Ser Gly Gly Tyr Phe Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ala
50 55 60

Pro Gly Thr Val Ser Met Asn Leu Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Thr
65 70 75 80

Ser Trp Ser Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys Gly Trp Ser Thr
85 90 95

Gly Ser Ala Arg Thr Ile Ser Tyr Ser Gly Thr Phe Asn Pro Ser Gly
100 105 110

Asn Ala Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Ser His Asp Pro Leu Val Glu
115 120 125

Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Phe
130 135 140

Met Gly Thr Val Asn Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr
145 150 155 160

Thr Arg Thr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Ala Thr Phe Thr Gln
165 170 175

Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Val Gly Gly Thr Ile Thr Thr
180 185 190

Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Ser His Gly Met Asn Leu Gly Arg
195 200 205

His Asp Tyr Gln Ile Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser
210 215 220

74
86

Ser Asn Ile Thr Ile Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
225 230 235 240

Gly

<210> 44
<211> 221
<212> PRT
<213> A. oryzae

<400> 44

Met Val Ser Phe Ser Ser Leu Leu Leu Ala Val Ser Ala Val Ser Gly
1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Gly Asp Ser Thr Leu Val Glu Leu Ala Lys Arg
20 25 30

Ala Ile Thr Ser Ser Glu Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser
35 40 45

Phe Trp Thr Asn Gly Gly Gly Asp Val Glu Tyr Thr Asn Gly Asn Gly
50 55 60

Gly Gln Tyr Ser Val Lys Trp Thr Asn Cys Asp Asn Phe Val Ala Gly
65 70 75 80

Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Lys Thr Val Thr Tyr Ser Gly Glu
85 90 95

Trp Glu Ser Asn Ser Asn Ser Tyr Val Ser Leu Tyr Gly Trp Thr Gln
100 105 110

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Lys Tyr Gly Asp Tyr Asp
115 120 125

Pro Ser Thr Gly Ala Thr Glu Leu Gly Thr Val Glu Ser Asp Gly Gly
130 135 140

Thr Tyr Lys Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Glu Asn Ala Pro Ser Ile Glu
145 150 155 160

Gly Thr Ser Thr Phe Asn Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Gly Arg
165 170 175

Val Gly Gly Thr Ile Thr Ala Gln Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Asn
180 185 190

Val Gly Leu Gln Leu Gly Thr His Asn Tyr Met Ile Leu Ala Thr Glu
195 200 205

Gly Tyr Lys Ser Ser Gly Ser Ala Thr Ile Thr Val Glu
210 215 220

<210> 45
<211> 216
<212> PRT
<213> C. purpurea

<400> 45

82
87

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

<210> 46
<211> 236
<212> PRT
<213> C. mixtus

<400> 46

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

Gln Trp Ser Asn Gly Thr Asn Asn Trp Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn
65 70 75 80

Pro Gly Gly Pro Lys Val Val Thr Tyr Ser Gly Ser Tyr Asn Val Asp
85 90 95

Asn Ser Gln Asn Ser Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro
100 105 110

Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Ile Glu Ser Tyr Gly Ser Tyr Asn Pro Ala
115 120 125

Ser Cys Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Gly Ser Phe Gln Ser Asp Gly Ala
130 135 140

Thr Tyr Asn Val Arg Arg Cys Gln Arg Val Gln Gln Pro Ser Ile Asp
145 150 155 160

Gly Thr Gln Thr Phe Tyr Gln Tyr Phe Ser Val Arg Ser Pro Lys Lys
165 170 175

Gly Phe Gly Gln Ile Ser Gly Thr Ile Thr Thr Ala Asn His Phe Asn
180 185 190

Phe Trp Ala Ser Lys Gly Leu Asn Leu Gly Asn His Asp Tyr Met Val
195 200 205

Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Arg Gly Ser Ser Asp Ile Thr Val
210 215 220

Ser Glu Gly Thr Gly Gly Thr Thr Ser Ser Ser Val
225 230 235

<210> 47
<211> 237
<212> PRT
<213> P. fluorescens cellulosa

<400> 47

Met Lys Leu Pro Thr Leu Gly Lys Cys Val Val Arg Thr Leu Met Gly
1 5 10 15

Ala Val Ala Leu Gly Ala Ile Ser Val Asn Ala Gln Thr Leu Ser Ser
20 25 30

Asn Ser Thr Gly Thr Asn Asn Gly Phe Tyr Tyr Thr Phe Trp Lys Asp
35 40 45

Ser Gly Asp Ala Ser Met Thr Leu Leu Ser Gly Gly Arg Tyr Gln Ser
50 55 60

Ser Trp Gly Asn Ser Thr Asn Asn Trp Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn
65 70 75 80

Pro Gly Asn Asn Ser Arg Val Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Tyr Gly Val
85 90 95

Asp Ser Ser Gln Asn Ser Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Ser
100 105 110

88
89

Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Ile Glu Ser Tyr Gly Ser Tyr Asn Pro
115 120 125

Ala Ser Cys Ser Gly Gly Thr Asp Tyr Gly Ser Phe Gln Ser Asp Gly
130 135 140

Ala Thr Tyr Asn Val Arg Arg Cys Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
145 150 155 160

Asp Gly Thr Gln Thr Phe Tyr Gln Tyr Phe Ser Val Arg Asn Pro Lys
165 170 175

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

Asn Phe Trp Ala Ser Lys Gly Leu Asn Leu Gly Asn His Asn Tyr Gln
195 200 205

Val Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Arg Gly Ser Ser Asp Ile Thr
210 215 220

Val Ser Glu Gly Thr Ser Gly Gly Gly Thr Ser Ser Val
225 230 235

<210> 48
<211> 217
<212> PRT
<213> P. cochleariae

<400> 48

Met Gln Phe Leu Ile Pro Val Val Ile Leu Cys Val Ser Leu Val Asp
1 5 10 15

Ser Gln Lys Val Leu Tyr Asn Asn Glu Ile Gly Phe Asn Asn Gly Phe
20 25 30

Tyr Tyr Ala Phe Trp Lys Asp Ser Gly Ser Ala Thr Phe Thr Leu Glu
35 40 45

Ser Gly Gly Arg Tyr Ala Gly Asn Trp Thr Thr Ser Thr Asn Asn Trp
50 55 60

Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Asn Ser Trp Arg Thr Val Asn
65 70 75 80

Tyr Ser Gly Tyr Tyr Gly Ile Asn Glu Tyr Ala Asn Ser Tyr Leu Ser
85 90 95

Leu Tyr Gly Trp Thr Thr Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Glu
100 105 110

Ser Tyr Gly Ser Tyr Ser Pro Leu Asn Cys Pro Gly Gly Thr Asp Glu
115 120 125

Gly Ser Phe Thr Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Gln Val Arg Lys Cys Arg
130 135 140

Arg Thr Asn Ala Pro Ser Ile Ile Gly Thr Gln Ser Phe Asp Gln Tyr
145 150 155 160

89
90

Phe Ser Val Arg Thr Pro Lys Lys Gly Phe Gly Gln Val Ser Gly Ser
165 170 175
Val Asn Phe Ala Asp His Val Gln Tyr Trp Ala Ser Lys Gly Leu Pro
180 185 190
Leu Gly Thr His Ala His Gln Ile Phe Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
195 200 205
Ser Gly Phe Ala Asp Ile Thr Val Ser
210 215

<210> 49
<211> 182
<212> PRT
<213> A. kawachi

<400> 49

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

<210> 50
<211> 211
<212> PRT
<213> A. niger

90
91

<400> 50

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

<210> 51

<211> 210

<212> PRT

<213> A .tubigensis

<400> 51

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

61
92

50 55 60

Phe Val Val Gly Leu Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ser Thr Ile Thr Tyr
65 70 75 80

Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Tyr Leu Ala Val Tyr
85 90 95

Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gln Ala Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asp Tyr
100 105 110

Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala Thr Ser Leu Gly Thr Val Tyr
115 120 125

Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys Thr Asp Thr Arg Thr Asn Glu
130 135 140

Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr Gln Tyr Phe Ser Val Arg
145 150 155 160

Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Ala Asn His Phe Asn
165 170 175

Phe Trp Ala His His Gly Phe Gly Asn Ser Asp Phe Asn Tyr Gln Val
180 185 190

Val Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala Gly Ser Ala Ser Val Thr Ile
195 200 205

Ser Ser
210

<210> 52
<211> 208
<212> PRT
<213> P. purpurogenum

<400> 52

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

Pro Leu Ser Thr Glu Leu Val Thr Arg Ser Ile Asn Tyr Val Gln Asn
20 25 30

Tyr Asn Gly Asn Leu Gly Ala Phe Ser Tyr Asn Glu Gly Ala Gly Thr
35 40 45

Phe Ser Met Tyr Trp Gln Gln Gly Val Ser Asn Asp Phe Val Val Gly
50 55 60

Leu Gly Arg Ser Thr Gly Ser Ser Asn Pro Ile Thr Tyr Ser Ala Ser
65 70 75 80

Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn
85 90 95

Ser Pro Gln Ala Glu Tyr Tyr Val Val Glu Ala Tyr Gly Asn Tyr Asn
100 105 110

Pro Cys Ser Ser Gly Ser Ala Thr Asn Leu Gly Thr Val Ser Ser Asp

92
93

115	120	125
Gly Gly Thr Tyr Gln Val Cys Thr Asp Thr Arg Val Asn Gln Pro Ser		
130	135	140
Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr Gln Phe Phe Ser Val Arg Gln Gly		
145	150	155
Ser Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Ile Ala Asn His Phe Asn Phe Trp		
	165	170
Ala Asn Asp Gly Phe Gly Asn Ser Asn Phe Asn Tyr Gln Val Val Ala		
	180	185
Val Glu Ala Trp Ser Gly Thr Gly Thr Ala Ser Val Thr Val Ser Ala		
	195	200
		205

<210> 53
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> P. purpurogenum
 <400> 53

Met Lys Val Thr Ala Ala Phe Ala Gly Leu Leu Ala Arg His Ser Pro		
1	5	10
Pro Leu Ser Thr Glu Leu Val Thr Arg Ser Ile Asn Tyr Val Gln Asn		
	20	25
Tyr Asn Gly Asn Leu Gly Ala Phe Ser Tyr Asn Glu Gly Ala Gly Thr		
	35	40
Phe Ser Met Tyr Trp Gln Gln Gly Val Ser Asn Asp Phe Val Val Gly		
	50	55
Leu Gly Arg Ser Thr Gly Ser Ser Asn Pro Ile Thr Tyr Ser Ala Ser		
65	70	75
Tyr Ser Ala Ser Gly Gly Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn		
	85	90
Ser Pro Gln Ala Glu Tyr Tyr Val Val Glu Ala Tyr Gly Asn Tyr Asn		
	100	105
Pro Cys Ser Ser Gly Ser Ala Thr Asn Leu Gly Thr Val Ser Ser Asp		
	115	120
Gly Gly Thr Tyr Gln Val Cys Thr Asp Thr Arg Val Asn Gln Pro Ser		
	130	135
Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe Thr Gln Phe Phe Ser Val Arg Gln Gly		
145	150	155
Ser Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Ile Ala Asn His Phe Asn Phe Trp		
	165	170
Ala Asn Asp Gly Phe Gly Asn Ser Asn Phe Asn Tyr Gln Val Val Ala		
	180	185
Val Glu Ala Trp Ser Gly Thr Gly Thr Ala Ser Val Thr Val Ser Ala		
		190

63
94

195	200	205
Asn Phe Asn Tyr Gln Val Leu Ala Val Glu Gly Phe Ser Gly Ser Gly		
210	215	220
Asn Ala Asn Met Lys Leu Ile Ser Gly		
225	230	
<210> 54		
<211> 229		
<212> PRT		
<213> T. reesei		
<400> 54		
Met Val Ala Phe Ser Ser Leu Ile Cys Ala Leu Thr Ser Ile Ala Ser		
1	5	10 15
Thr Leu Ala Met Pro Thr Gly Leu Glu Pro Glu Ser Ser Val Asn Val		
	20	25 30
Thr Glu Arg Gly Met Tyr Asp Phe Val Leu Gly Ala His Asn Asp His		
	35	40 45
Arg Arg Arg Ala Ser Ile Asn Tyr Asp Gln Asn Tyr Gln Thr Gly Gly		
	50	55 60
Gln Val Ser Tyr Ser Pro Ser Asn Thr Gly Phe Ser Val Asn Trp Asn		
65	70	75 80
Thr Gln Asp Asp Phe Val Val Gly Val Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ser		
	85	90 95
Ala Pro Ile Asn Phe Gly Gly Ser Phe Ser Val Asn Ser Gly Thr Gly		
	100	105 110
Leu Leu Ser Val Tyr Gly Trp Ser Thr Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr		
	115	120 125
Ile Met Glu Asp Asn His Asn Tyr Pro Ala Gln Gly Thr Val Lys Gly		
130	135	140
Thr Val Thr Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Thr Ile Trp Glu Asn Thr Arg		
145	150	155 160
Val Asn Glu Pro Ser Ile Gln Gly Thr Ala Thr Phe Asn Gln Tyr Ile		
	165	170 175
Ser Val Arg Asn Ser Pro Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gln Asn		
	180	185 190
His Phe Asn Ala Trp Ala Ser Leu Gly Leu His Leu Gly Gln Met Asn		
	195	200 205
Tyr Gln Val Val Ala Val Glu Gly Trp Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ser		
210	215	220
Gln Ser Val Ser Asn		
225		
<210> 55		

44
95

<211> 227
<212> PRT
<213> B. pumilus

<400> 55

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

<210> 56
<211> 228
<212> PRT
<213> B. pumilus

<400> 56

Met	Asn	Leu	Arg	Lys	Leu	Arg	Leu	Leu	Phe	Val	Met	Cys	Ile	Gly	Leu
1				5					10					15	

645
96

Thr Leu Ile Leu Thr Ala Val Pro Ala His Ala Arg Thr Ile Thr Asn
20 25 30

Asn Glu Met Gly Asn His Ser Gly Tyr Asp Tyr Glu Leu Trp Lys Asp
35 40 45

Tyr Gly Asn Thr Ser Met Thr Leu Asn Asn Gly Gly Ala Phe Ser Ala
50 55 60

Gly Trp Asn Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Asp Ser Thr Arg Thr His His Gln Leu Gly Asn Ile Ser Ile Asn Tyr
85 90 95

Asn Ala Ser Phe Asn Pro Gly Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Val Tyr Gly
100 105 110

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

Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Ala Tyr Lys Gly Ser Phe Tyr Ala Asp Gly
130 135 140

Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
145 150 155 160

Ile Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Thr Lys
165 170 175

Arg Thr Ser Gly Thr Val Ser Val Ser Ala His Phe Arg Lys Trp Glu
180 185 190

Ser Leu Gly Met Pro Met Gly Lys Met Tyr Glu Thr Ala Phe Thr Val
195 200 205

Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Val Met Thr Asn Gln Leu
210 215 220

Phe Ile Gly Asn
225

<210> 57
<211> 261
<212> PRT
<213> C. acetobutylicum

<400> 57

Met Leu Arg Arg Lys Val Ile Phe Thr Val Leu Ala Thr Leu Val Met
1 5 10 15

Thr Ser Leu Thr Ile Val Asp Asn Thr Ala Phe Ala Ala Thr Asn Leu
20 25 30

Asn Thr Thr Glu Ser Thr Phe Ser Lys Glu Val Leu Ser Thr Gln Lys
35 40 45

Thr Tyr Ser Ala Phe Asn Thr Gln Ala Ala Pro Lys Thr Ile Thr Ser
50 55 60

96
97

Asn Glu Ile Gly Val Asn Gly Gly Tyr Asp Tyr Glu Leu Trp Lys Asp
65 70 75 80

Tyr Gly Asn Thr Ser Met Thr Leu Lys Asn Gly Gly Ala Phe Ser Cys
85 90 95

Gln Trp Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe
100 105 110

Asn Asp Thr Gln Thr Tyr Lys Gln Leu Gly Asn Ile Ser Val Asn Tyr
115 120 125

Asp Cys Asn Tyr Gln Pro Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Val Tyr Gly
130 135 140

Trp Thr Ser Ser Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly
145 150 155 160

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

Gly Gly Ile Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Ile Asn Gln Pro Ser
180 185 190

Ile Gln Gly Asn Thr Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr
195 200 205

Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Lys His Phe Ala Ala Trp
210 215 220

Glu Ser Lys Gly Met Pro Leu Gly Lys Met His Glu Thr Ala Phe Asn
225 230 235 240

Ile Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Lys Ala Asp Val Asn Ser Met Ser
245 250 255

Ile Asn Ile Gly Lys
260

<210> 58
<211> 234
<212> PRT
<213> C. thermocellum

<400> 58

Met Lys Gln Lys Leu Leu Val Thr Phe Leu Ile Leu Ile Thr Phe Thr
1 5 10 15

Val Ser Leu Thr Leu Phe Pro Val Asn Val Arg Ala Asp Val Val Ile
20 25 30

Thr Ser Asn Gln Thr Gly Thr Gly Gly Gly Tyr Asn Phe Glu Tyr Trp
35 40 45

Lys Asp Thr Gly Asn Gly Thr Met Val Leu Lys Asp Gly Gly Ala Phe
50 55 60

Ser Cys Glu Trp Ser Asn Ile Asn Asn Ile Leu Phe Arg Lys Gly Phe
65 70 75 80

97
98

Lys Tyr Asp Glu Thr Lys Thr His Asp Gln Leu Gly Tyr Ile Thr Val
85 90 95

Thr Tyr Ser Cys Asn Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Gly Val
100 105 110

Tyr Gly Trp Thr Ser Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Ile Glu Ser
115 120 125

Trp Gly Thr Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys Gly Thr Ile Thr
130 135 140

Val Asp Gly Gly Thr Tyr Glu Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Val Asn Gln
145 150 155 160

Pro Ser Ile Lys Gly Thr Ala Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg
165 170 175

Thr Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Thr Glu His Phe Lys
180 185 190

Ala Trp Glu Arg Leu Gly Met Lys Met Gly Lys Met Tyr Glu Val Ala
195 200 205

Leu Val Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Lys Ala Asp Val Thr Ser
210 215 220

Met Thr Ile Thr Val Gly Asn Ala Pro Ser
225 230

<210> 59
<211> 230
<212> PRT
<213> Bacillus sp 41M-1

<400> 59

Met Lys Gln Val Lys Ile Met Phe Leu Met Thr Met Phe Leu Gly Ile
1 5 10 15

Gly Leu Leu Phe Phe Ser Glu Asn Ala Glu Ala Ala Ile Thr Ser Asn
20 25 30

Glu Ile Gly Thr His Asp Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Trp Lys Asp Ser
35 40 45

Gly Gly Ser Gly Ser Met Thr Leu Asn Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ala
50 55 60

Gln Trp Ser Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Asp Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Ile Gly Asn Met Ser Ile Asn Tyr
85 90 95

Gly Ala Thr Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Thr Val Tyr Gly
100 105 110

Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Phe Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly
115 120 125

42
99

Thr Trp Arg Pro Pro Gly Gly Thr Pro Lys Gly Thr Ile Asn Val Asp
130 135 140

Gly Gly Thr Tyr Gln Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Tyr Asn Gln Pro Ser
145 150 155 160

Ile Lys Gly Thr Ala Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg Thr Ser
165 170 175

Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Glu His Phe Arg Ala Trp
180 185 190

Glu Ser Leu Gly Met Asn Met Gly Asn Met Tyr Glu Val Ala Leu Thr
195 200 205

Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Val Tyr Ser Asn Thr
210 215 220

Leu Thr Ile Gly Gly Gln
225 230

<210> 60
<211> 217
<212> PRT
<213> P. multivesiculatum

<400> 60

Glu Lys Val Ile Cys Leu Leu Ile Ala Leu Phe Gly Leu Ile Glu Ala
1 5 10 15

Gln Thr Phe Tyr Asn Asn Ala Gln Gly Gln Ile Asp Gly Leu Asp Tyr
20 25 30

Glu Leu Trp Lys Asp Thr Gly Thr Thr Ser Met Thr Leu Leu Gly Gly
35 40 45

Gly Lys Phe Ser Cys Ser Trp Ser Asn Ile Asn Asn Cys Leu Phe Arg
50 55 60

Ile Gly Lys Lys Trp Asn Cys Gln Tyr Glu Trp Trp Glu Leu Gly Thr
65 70 75 80

Val Leu Val Asn Tyr Asp Val Asp Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr
85 90 95

Leu Cys Ile Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile
100 105 110

Val Glu Ser Trp Gly Ser Trp Arg Pro Pro Gly Gly Ser Pro Met Asn
115 120 125

Thr Met Tyr Val Asp Asp Gly Gln Tyr Asp Val Tyr Val Thr Asp Arg
130 135 140

Ile Asn Gln Pro Ser Ile Asp Gly Asn Thr Asn Phe Lys Gln Tyr Trp
145 150 155 160

Ser Val Arg Thr Gln Lys Lys Thr Arg Gly Thr Val His Val Asn His
165 170 175

His Phe Tyr Asn Trp Gln Glu Met Gly Leu Lys Val Gly Lys Val Tyr
180 185 190

Glu Ala Ser Leu Asn Ile Glu Gly Tyr Gln Ser Ala Gly Ser Ala Thr
195 200 205

Val Asn Lys Asn Glu Val Val Gln Thr
210 215

<210> 61
<211> 175
<212> PRT
<213> P multivesiculatum

<400> 61

Met Thr Leu Leu Gly Gly Gly Lys Phe Ser Cys Asn Trp Ser Asn Ile
1 5 10 15

Gly Asn Ala Leu Phe Arg Ile Gly Lys Lys Trp Asp Cys Thr Lys Thr
20 25 30

Trp Gln Gln Leu Gly Thr Ile Ser Val Ala Tyr Asn Val Asp Tyr Arg
35 40 45

Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Met Cys Val Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro
50 55 60

Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly Ser Trp Arg Pro Pro
65 70 75 80

Gly Ser Asn Ser Met Gly Thr Ile Asn Val Asp Gly Gly Thr Tyr Asp
85 90 95

Ile Tyr Val Thr Asp Arg Ile Asn Gln Pro Ser Ile Asp Gly Thr Thr
100 105 110

Thr Phe Lys Gln Phe Trp Ser Val Arg Thr Gln Lys Lys Thr Ser Gly
115 120 125

Val Ile Ser Val Ser Lys His Phe Glu Ala Trp Thr Ser Lys Gly Leu
130 135 140

Asn Leu Gly Leu Met Tyr Glu Ala Ser Leu Thr Ile Glu Gly Tyr Gln
145 150 155 160

Ser Ser Gly Ser Ala Thr Val Asn Gln Asn Asp Val Thr Gly Gly
165 170 175

<210> 62
<211> 265
<212> PRT
<213> R. albus

<400> 62

Met Arg Asn Asn Phe Lys Met Arg Val Met Ala Gly Val Ala Ala Val
1 5 10 15

Ile Cys Leu Ala Gly Val Leu Gly Ser Cys Gly Asn Ser Ser Asp Lys
20 25 30

99
100

100
101

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

<210> 63
<211> 226
<212> PRT
<213> Caldicellulosiruptor sp

<400> 63

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

101
102

Phe Ser Cys Gln Trp Ser Asn Ile Asn Asn Ala Leu Phe Arg Thr Gly
50 55 60

Lys Lys Phe Ser Thr Ala Trp Asn Gln Leu Gly Thr Val Lys Ile Thr
65 70 75 80

Tyr Ser Ala Thr Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Ile Tyr
85 90 95

Gly Trp Ser Arg Asn Pro Leu Val Glu Phe Tyr Ile Val Glu Ser Trp
100 105 110

Gly Ser Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Thr Val Thr Ile
115 120 125

Asp Gly Ala Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Val Asn Gln Pro
130 135 140

Ser Ile Glu Gly Thr Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Thr
145 150 155 160

Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Asp His Phe Lys Ala
165 170 175

Trp Ala Ala Lys Gly Leu Asn Leu Gly Thr Ile Asp Gln Ile Thr Leu
180 185 190

Cys Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Ile Thr Gln Asn
195 200 205

Thr Phe Thr Ile Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser Asn Gly Ser Asn
210 215 220

Asn Gly
225

<210> 64
<211> 232
<212> PRT
<213> D. thermophilum

<400> 64

Met Phe Leu Lys Lys Leu Ser Lys Leu Leu Leu Val Val Leu Leu Val
1 5 10 15

Ala Val Tyr Thr Gln Val Asn Ala Gln Thr Ser Ile Thr Leu Thr Ser
20 25 30

Asn Ala Ser Gly Thr Phe Asp Gly Tyr Tyr Tyr Glu Leu Trp Lys Asp
35 40 45

Thr Gly Asn Thr Thr Met Thr Val Tyr Thr Gln Gly Arg Phe Ser Cys
50 55 60

Gln Trp Ser Asn Ile Asn Asn Ala Leu Phe Arg Thr Gly Lys Lys Tyr
65 70 75 80

Asn Gln Asn Trp Gln Ser Leu Gly Thr Ile Arg Ile Thr Tyr Ser Ala
85 90 95

102
108

Thr Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Ile Tyr Gly Trp Ser
100 105 110

Thr Asn Pro Leu Val Glu Phe Tyr Ile Val Glu Ser Trp Gly Asn Trp
115 120 125

Arg Pro Pro Gly Ala Thr Ser Leu Gly Gln Val Thr Ile Asp Gly Gly
130 135 140

Thr Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Thr Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile Val
145 150 155 160

Gly Thr Ala Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Thr Ser Lys Arg
165 170 175

Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Thr Asp His Phe Arg Ala Trp Ala Asn
180 185 190

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

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Ile Thr Gln Asn Thr Phe Ser
210 215 220

Gln Gly Ser Ser Ser Gly Ser Ser
225 230

<210> 65
<211> 255
<212> PRT
<213> R. flavefaciens

<400> 65

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

Leu Met Ile Ala Ser Ala Ala Pro Val Val Ala Ser Ala Ala Asp Gln
20 25 30

Gln Thr Arg Gly Asn Val Gly Gly Tyr Asp Tyr Glu Met Trp Asn Gln
35 40 45

Asn Gly Gln Gly Gln Ala Ser Met Asn Pro Gly Ala Gly Ser Phe Thr
50 55 60

Cys Ser Trp Ser Asn Ile Glu Asn Phe Leu Ala Arg Met Gly Lys Asn
65 70 75 80

Tyr Asp Ser Gln Lys Lys Asn Tyr Lys Ala Phe Gly Asn Ile Val Leu
85 90 95

Thr Tyr Asp Val Glu Tyr Thr Pro Arg Gly Asn Ser Tyr Met Cys Val
100 105 110

Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Met Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Gly
115 120 125

Trp Gly Asp Trp Arg Pro Pro Gly Asn Asp Gly Glu Val Lys Gly Thr
130 135 140

103
104

Val Ser Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Asp Ile Arg Lys Thr Met Arg Tyr
145 150 155 160

Asn Gln Pro Ser Leu Asp Gly Thr Ala Thr Phe Pro Gln Tyr Trp Ser
165 170 175

Val Arg Gln Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asn Gln Thr Asn Tyr Met Lys
180 185 190

Gly Thr Ile Asp Val Thr Lys His Phe Asp Ala Trp Ser Ala Ala Gly
195 200 205

Leu Asp Met Ser Gly Thr Leu Tyr Glu Val Ser Leu Asn Ile Glu Gly
210 215 220

Tyr Arg Ser Asn Gly Ser Ala Asn Val Lys Ser Val Ser Val Thr Gln
225 230 235 240

Gly Gly Ser Ser Asp Asn Gly Gly Gln Gln Gln Asn Asn Asp Trp
245 250 255

<210> 66
<211> 280
<212> PRT
<213> P. stipitis

<400> 66

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

Leu Leu His Val Leu Ser His Ala Pro Thr Lys Met Leu Thr Thr Asp
20 25 30

Val Leu Leu Thr Arg Cys Met His Leu Cys His Phe Arg Thr Ser Asp
35 40 45

Ser Val Tyr Thr Asn Glu Thr Ser Glu Glu Arg Ser Met Ser Asp Arg
50 55 60

Leu Asn Ile Thr Arg Val Met Ser Tyr Asp Arg Trp Thr Asp Leu Val
65 70 75 80

Gly Glu Leu Glu Val Arg Glu Leu Lys His Val Met Ser His Arg Thr
85 90 95

Tyr Ser Leu Cys Asp Leu Ser Cys Ser Thr Val Leu Asp Ser Asn Ser
100 105 110

Met Phe Ser Leu Gly Lys Gly Trp Gln Ala Ile Ser Ser Arg Gln Gly
115 120 125

Val Gly Ala Thr Val Tyr Gly Trp Thr Arg Ser Pro Leu Leu Ile Glu
130 135 140

Tyr Tyr Val Val Asp Ser Trp Gly Ser Tyr His Pro Ser Asn Thr Ile
145 150 155 160

Thr Gly Thr Phe Val Thr Val Lys Cys Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile
165 170 175

Tyr Thr Ala Val Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Thr Phe
 180 185 190
 Thr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Ala Thr Ile Gln Leu Ala Val
 195 200 205
 Ile Lys Pro Leu Thr Leu Gln Asn Ala Thr Ile Thr Phe Thr Phe Ser
 210 215 220
 Asn His Phe Asp Ala Trp Lys Thr Met Thr Leu Glu Ala Thr His Ser
 225 230 235 240
 Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ile Thr Tyr Glu Gln Pro His Gln
 245 250 255
 Pro His Arg Asn Thr Trp Ala Thr Ser Leu Thr Ser Gln Thr Lys His
 260 265 270
 Thr Ala Arg Ser Leu Pro Ile Asn
 275 280

104
105

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No. PCT / IB 01 / 00426

08 MARCH 2001 (08.03.01)

International Filing Date

INTERNATIONAL BUREAU OF WIPO
PCT International Application
Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) P8526WO CTH

Box No. I TITLE OF INVENTION
ENZYME

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Danisco A/S
Langebrogade 1
PO Box 17
DK-1001 Copenhagen K
Denmark

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (i.e. country) of nationality: DK

State (i.e. country) of residence: DK

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SIBBESEN, Ole
Veerebrovej 117B
2880 Bagved
Denmark

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below)

State (i.e. country) of nationality: DK

State (i.e. country) of residence: DK

This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

HARDING, Charles Thomas
D Young & Co
21 New Fetter Lane
London
EC4A 1DA
United Kingdom

Telephone No.

023 8071 9500

Facsimile No.

023 8071 9800

Teleprinter No.

477667 YOUNGS G

☐ Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT (S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
If none of the following sub-boxes is used, this sheet is not to be included in the request.	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) SØRENSEN, Jens Friis Nordvestpassagen 93 DK-8200 Aarhus Denmark	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below)
State (that is, country) of nationality: DK	State (that is, country) of residence: DK
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below)
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below)
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below)
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet	

Box No. V DESIGNATION F STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, TZ United Republic of Tanzania, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, please specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|---|---|
| ☒ AE United Arab Emirates | ☒ LS Lesotho |
| ☒ AL Albania | ☒ LT Lithuania |
| ☒ AM Armenia | ☒ LU Luxembourg |
| ☒ AT Austria | ☒ LV Latvia |
| ☒ AU Australia | ☒ MA Morocco |
| ☒ AZ Azerbaijan | ☒ MD Republic of Moldova |
| ☒ BA Bosnia and Herzegovina | ☒ MG Madagascar |
| ☒ BB Barbados | ☒ MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| ☒ BG Bulgaria | |
| ☒ BR Brazil | ☒ MN Mongolia |
| ☒ BY Belarus | ☒ MW Malawi |
| ☒ CA Canada | ☒ MX Mexico |
| ☒ CH AND LI Switzerland and Liechtenstein | ☒ NO Norway |
| ☒ CN China | ☒ NZ New Zealand |
| ☒ CR Costa Rica | ☒ PL Poland |
| ☒ CU Cuba | ☒ PT Portugal |
| ☒ CZ Czech Republic | ☒ RO Romania |
| ☒ DE Germany | ☒ RU Russian Federation |
| ☒ DK Denmark | ☒ SD Sudan |
| ☒ DM Dominica | ☒ SE Sweden |
| ☒ EE Estonia | ☒ SG Singapore |
| ☒ ES Spain | ☒ SI Slovenia |
| ☒ FI Finland | ☒ SK Slovakia |
| ☒ GB United Kingdom | ☒ SL Sierra Leone |
| ☒ GD Grenada | ☒ TJ Tajikistan |
| ☒ GE Georgia | ☒ TM Turkmenistan |
| ☒ GH Ghana | ☒ TR Turkey |
| ☒ GM Gambia | ☒ TT Trinidad and Tobago |
| ☒ HR Croatia | ☒ TZ United Republic of Tanzania |
| ☒ HU Hungary | ☒ UA Ukraine |
| ☒ ID Indonesia | ☒ UG Uganda |
| ☒ IL Israel | ☒ US United States of America |
| ☒ IN India | |
| ☒ IS Iceland | ☒ UZ Uzbekistan |
| ☒ JP Japan | ☒ VN Viet Nam |
| ☒ KE Kenya | ☒ YU Yugoslavia |
| ☒ KG Kyrgyzstan | ☒ ZA South Africa |
| ☒ KP Democratic People's Republic of Korea | ☒ ZW Zimbabwe |
| ☒ KR Republic of Korea | |
| ☒ KZ Kazakhstan | |
| ☒ LC Saint Lucia | |
| ☒ LK Sri Lanka | |
| ☒ LR Liberia | |

Check-boxes reserved for designating States (for the purposes of a national patent) which have become party to the PCT after the issuance of this sheet:

- ☒ **DZ** Algeria
- ☒ **AG** Antigua and Barbuda
- ☒ **MZ** Mozambique
- ☒ **BZ** Belize
- ☒ **CO** Colombia

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation (including fees) must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Supplemental Box

If the Supplemental Box is not used, this sheet need not be included in the request.

Use this box in the following cases:

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information:

In such case, write "Continuation of Box No. ..." [Indicate the number of the Box] and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient;

In particular:

(i) If more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available:

In such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (i.e. country) of residence if no State of residence is indicated below;

(ii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked:

In such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;

(iii) If, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America:

In such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;

(iv) If, in addition to the agent(s) indicated in Box No. IV, there are further agents:

In such case, write "Continuation of Box No. IV and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. IV;

(v) If, in Box No. V, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. V, the name of the United States of America is accompanied by an indication "Continuation" or "Continuation-in-part":

In such case, write "Continuation of Box No. V" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;

(vi) If there are more than three earlier applications whose priority is claimed:

In such case, write "Continuation of Box No. VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. VI.

2. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty:

In such case, write "Statement Concerning Non-Prejudicial Disclosures or Exceptions to Lack of Novelty" and furnish that statement below.

Continuation of Box No. IV

PILCH, Adam John Michael
CRISP, David Norman
ROBINSON, Nigel Alexander Julian
HARRIS, Ian Richard
HARDING, Charles Thomas
TURNER, James Arthur
MALLALIEU, Catherine Louise
PRATT, Richard Wilson
PRICE, Paul Anthony King
HOLMES, Miles Keeton
HORNER, David Richard
MASCHIO, Antonio
NACHSHEN, Neil
POTTER, Julian Mark
HAINES, Miles John
MATHER, Belinda Jane
BODEN, Keith McMurray
DEVILE, Jonathan Mark
TANNER, James Percival
KHOO, Chong Yee
HOLLIDAY, Louise Caroline

Box No. VI PRIORITY CLAIM



Further priority claims are indicated in the Supplemental Box

Filing Date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
Item (1) 8 Mar 2000 8/3/2000	0005585.5	GB		
Item (2) 27 Jun 2000 27/6/2000	0015751.1	GB		
Item (3)				

☐ The receiving Office is hereby requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):

* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA)
(If two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):

ISA / EPO

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority):

Date (day/month/year)

Number:

Country (or regional Office):

Box No. VII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING

This international application contains the following number of sheets:

request : 5
description (excluding
sequence listing part) : 52
claims : 4
abstract : 1
drawings : 5
sequence listing part of
description : 2
Total number of
sheets : 69

This international application is accompanied by the item(s) marked below:

- ☐ fee calculation sheet
- ☐ separate signed power of attorney
- ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any:
- ☐ statement explaining lack of signature
- ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s):
- ☐ translation of international application into (language):
- ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material
- ☐ nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form
- ☒ other (specify): Letter

Figure of the drawings which
should accompany the abstract:

Language of filing of the
international application:

English

Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request)


HARDING, Charles Thomas

For receiving Office use only

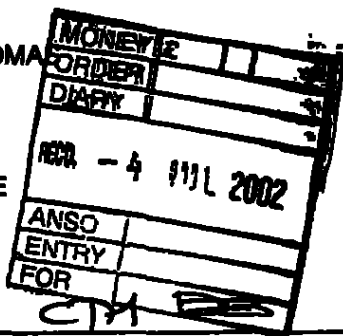
1. Date of actual receipt of the purported international application: 08 MARCH 2001 08-03-01	2. Drawings:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	☐ received:
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	☐ not received:
5. International Searching Authority specified (if two or more are competent): ISA / EP	6. ☒ Transmittal of search copy delayed until search fee paid

For International Bureau use only

Date of receipt of the record copy by
the International Bureau:

H10
111From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

Harding, Charles THOMAS
D YOUNG & CO
21 New Fetter Lane
London EC4A 1DA
GRANDE BRETAGNE

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
(PCT Rule 71.1)Date of mailing
(day/month/year) 03.07.2002Applicant's or agent's file reference
P8526WO CTH

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB01/00426International filing date (day/month/year)
08/03/2001Priority date (day/month/year)
08/03/2000Applicant
DANISCO A/S et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/

European Patent Office
D-80288 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4485

Authorized officer

Faux, K

Tel. +49 89 2369-8062



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

112

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P8526WO CTH	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/IB01/00426	International filing date (day/month/year) 08/03/2001	Priority date (day/month/year) 08/03/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N9/24		
Applicant DANISCO A/S et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet.

- ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 13/08/2001	Date of completion of this report 03.07.2002
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80286 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Stegen, C Telephone No. +49 89 2399 7804 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/IB01/00426

HP
113

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the International application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17):*

Description, pages:

1-52 as originally filed

Claims, No.:

1-22 as originally filed

Drawings, sheets:

1/5-5/5 as originally filed

Sequence listing part of the description, pages:

1-57, filed with the letter of 29.05.01

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☒ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

114 H3

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/IB01/00426

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-22 all partial.

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 1-22 all partial.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/IB01/00426

115 114

- ☐ restricted the claims.
- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with.
- ☐ not complied with for the following reasons:
4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:
- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-22 (all partial).

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	6-7, 9-10, 13-15
	No:	Claims	1-5, 8, 11, 12, 16-22
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	none
	No:	Claims	1-22
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-22
	No:	Claims	none

**2. Citations and explanations
see separate sheet**

116 *HS*

Re Item I

Basis of the opinion

The first written opinion is based on the searched subject-matter of claims 1 to 22 (see also Re Item III).

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The ISA found the subject-matter of claims 1 to 22 insufficiently disclosed (Article 5 PCT) and supported (Article 6 PCT) by the description. Therefore, only a partial search based on the general idea of the alleged invention was carried out.

According to Rule 66.1(e) PCT, claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination.

Re Item IV

Lack of unity of invention

In view of the description and the wording of the claims, the residues listed in claims 6 to 10 are considered surface residues. From the examples it is clear that not every substitution of said residues achieves the desired property. Thus, the listed residues form just a basis for the subsequent screening ^{for} suitable mutants. For a general strategy of mutagenesis substitutions on the surface of the enzyme, possibly near the catalytic cleft, appear an obvious option of design (see also Re Item V). Therefore, the concept of mutating surface residues in order to find a suitable mutant is considered obvious. Thus, said concept cannot be considered inventive. Consequently, the listed mutants are not linked by an inventive concept according to Rule 13 PCT. Thus, lack of unity arises from the multiplicity of mutants.

However, the present Authority considers that examination of the subject-matter relating to said mutants may be carried out without undue effort and according to rule 68.1 PCT did not invite the Applicant to restrict the claims or pay additional fees.

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1A HC

1) The Application

The present application is based on the construction of variant xylanase polypeptides which show an altered sensitivity to xylanase inhibitors.

2) The Prior Art

Reference is made to the following documents:

- D1: WO 00 39289 A (SOERENSEN JENS FRISBAEK ;DANISCO (DK); SIBBESSEN OLE (DK)) 6 July 2000
- D2: DATABASE STN INTERNATIONAL [Online] MCLAUCHLAN W R ET AL: 'Xylanase inhibitors from cereals: implications for baking, brewing and plant technology' retrieved from CAPLUS, accession no. 2001:287270 XP002901834 -& MCLAUCHLAN W R ET AL: 'Xylanase inhibitors from cereals: implication for baking, brewing and plant technology' VTT SYMP (2000) 207 2ND EUROPEAN SYMPOSIUM ON ENZYMES IN GRAIN PROCESSING, 8 - 10 December 1999, pages 55-61, HELSINKI / FINLAND ISSN: 0357-9387
- D3: MCLAUCHLAN W R ET AL: 'A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases' BIOCHEM J., vol. 338, - 1999 pages 441-446
- D4: EP-A-0 979 830 (TNO) 16 February 2000 (2000-02-16)
- D5: US 5306633 (cited in D1); 26 April 1994;
- D5a: EP 0585617 B1 (family member of D5) 9 March 1994;

Documents D1 and D2 were published between the alleged priority date and the filing date of the present application. The preliminary examination report has been established under the presumption that the priority claim to the date of 08.03.2000 is valid. Therefore, D1 and D2 are not considered prior art of the present application, but may be relevant for technical information.

D3 discloses an inhibitor of family-11 xylanases which was isolated from wheat. The same inhibitor is also disclosed by the patent application D4. D4 suggests to use the inhibitor in a method of screening for inhibitor resistant xylanases.

D5 is a US patent cited in D1 (p.2, l.6 to 9) and is a family member of D5a (European patent). Both D5 and D5a disclose a variant xylanase isolated from *B. subtilis*, which shows improved characteristics in relation to its use in baking. The variant comprises 6 amino acid substitutions within the mature polypeptide (D5: column 3, l.37-46; D5a: p.10, underlined residues of SEQ ID NO 2) which are at positions 2, 15, 122, 143, 169 and 175 of SEQ ID 1 of the present application.

117
118

3) Novelty and Clarity

3.1 Variants or mutants of xylanase polypeptides are well known in the prior art (see e.g. D5). Mutants of xylanases have been made e.g. in order to improve thermostability and therefore general performance e.g. in baking. However, the parameter of sensitivity to inhibitors has not been addressed.

Claims 1 to 5, 8, 11, 12 and 16 do not give sufficient technical features in order to delineate already known xylanase variants or mutants from the claimed xylanase variants. The functional feature of "altered sensitivity to a xylanase inhibitor" is a vague parameter and renders the scope of the claim unclear. Therefore, any known variant or mutant later shown to have an "altered sensitivity" would be considered to fall within the claimed scope and would thus be novelty destroying to said claims.

3.2 D5 discloses a variant xylanase showing improved characteristics in relation to its use in baking, e.g. improved consistency and increased volume of bread (D5: Abstract; D1: p.2, l.6-8). Although this aspect was not addressed in D5, this characteristic may even be based on a reduced sensitivity to xylanase inhibitors. In the postpublished document D1 the xylanases of D5 was compared to the "wild type" xylanase of *B. subtilis*: D1 studied the effect of a wheat flour inhibitor on different xylanases. The xylanase of D5 ("Röhm") was significantly less inhibited by the inhibitor than the "wild type" enzyme (D1: p.54, l.22-32; p.62, l.21 to p.63, l.18). Thus, the "Röhm" xylanase disclosed in D5 falls within the scope of claims 1 and 2. The list of modified residues in claim 6 of the present application includes all modified positions of D5 except pos.169. The list of claim 7 comprises three, claim 9 four and claim 10 five of the substituted positions of the variant disclosed by D5. Thus, the variant in D5 comprises more modifications than listed in claims 6, 7, 9 and 10. Claim 8 is directed to a variant of claim 7 which additionally comprises modifications at "any of the other amino acids". Interpreted in the broadest sense the variant of D5 falls within the scope of this claim. Same applies to claims 3 to 5.

Therefore, the xylanase, the encoding nucleic acid and the methods of D5 fall within the scope of claims 1 to 5, 8, 11, 12, and 16 to 22 and are therefore considered novelty destroying to said claims.

4) Inventive Step

4.1 The present application is based on the construction of xylanase variants which show reduced sensitivity to a xylanase inhibitor.

4.2 Document D5 discloses a variant xylanase showing improved characteristics in

relation to its use in baking, e.g. improved consistency and increased loaf volume. The variant comprises 6 amino acid substitutions within the mature polypeptide as compared to "wild type" xylanase of *B. subtilis* (corresponding to pos. 2, 15, 122, 143, 169, 175 of SEQ ID 1 of the present application). However, this document was published before xylanase inhibitors were isolated. Therefore, the aspect of sensitivity to inhibitors was not addressed in this document. On the other hand, the isolation of said inhibitors from wheat (see D3 and D4) rendered it obvious to the person skilled in the art, that these inhibitors may also influence the "baking performance" of xylanases. Moreover, D4 actually suggested to use the xylanase inhibitor to screen for variant xylanases with reduced sensitivity to said inhibitor.

- 4.3 In the light of the prior art the technical problem to be solved can be seen as the provision of alternative xylanases which show reduced sensitivity to xylanase inhibitors.

The solution to this problem provided by the Applicant is the construction of certain mutants which are then screened for their reduced sensitivity to a certain xylanase inhibitor. The examples show three mutants which indeed have the desired property (see Example 4, p.44, l.8 to p.46, l.7). Therefore, the above mentioned technical problem is solved, particularly by said mutants.

- 4.4 As xylanase encoding sequences are known in the art site-directed mutagenesis is an obvious strategy in order to construct alternative "variants".
- 4.5 Claims 6 to 10 list amino acids residues suggested to be modified. Those listed in claims 6 to 9 are selected from residues located on the surface of the polypeptide (see p.6, l.19-30). The list of claim 10 comprises additional residues, some of which, although designated as surface amino acids, were not among those cited as such in the description (compare claim 10 with p.5, l.19-30 and p.8, l.23-28).
- 4.6 The discrepancy between the description and claim 10 notwithstanding, the surface localization appears to be the only criterion for the selection of residues to be modified. It can be assumed that an inhibitor binds somewhere on the surface of a protein, even if mainly affecting the catalytic site. Thus, the selection of surface residues for substitution is an obvious option for mutagenesis. Therefore, this general approach cannot be considered inventive.
- 4.7 Furthermore, the examples show, that said criterion is not sufficient for achieving the desired effect. Only substitutions at certain positions and by certain amino acids achieve said effect (see Example 4). Therefore, the positions listed in the claims are only the basis for a subsequent screening.

- 4.8 Consequently, said technical feature is not sufficient for clearly defining the claimed variant. A definition by the functional feature "modifications such that the polypeptide has an altered sensitivity to xylanase inhibitor" is considered unclear, as it only comprises the formulation of the underlying problem (see also Re Item 3.1).
- 4.9 Claim 13 is directed to a method of altering the sensitivity of xylanase to an inhibitor by modifying one or more amino acids. Again, the only technical feature is the modification of one or more amino acid residues. This cannot be considered inventive. Same applies to claims 14 and 15.
- 4.10 The solution proposed by claims 1 to 22 cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT).
At best, specific mutants having the desired property may form the basis for any inventive subject-matter.

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

USUARIO RADICADOR

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD [] [X]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [] [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [] [X]
- Descripción de la invención [] [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes [] [X]
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas [] [X]

COMPLETA [X]

INCOMPLETA [] []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. [] []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [] []
- Representación gráfica y foto gráfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño. [] []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. [] []

COMPLETA []

INCOMPLETA [] []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de trazado. [] []
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud. [] []
- Representación gráfica del esquema de trazado [] []
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. [] []

COMPLETA []

INCOMPLETA [] []

Firma Responsable

Fecha:

Carrera 13 No. 27-00 Piso 2 mezzanina
Conmutador: 382 08 49
Fax: 350 52 20 e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
GERMAN CASTILLO GRAU
Apoderado
DANISCO AIS

Oficio N° 5594

ASUNTO:	Radicación N°	02-74872
	Solicitud internacional	PCT/IB2001/000428
	Fecha Inicio fase nacional	08/10/2002
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	330
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- ☐ La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subseguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.
- ☐

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

78 JUL 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, _____.