

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 440**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/42** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12N 15/56** (2006.01)

**A21D 8/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2001 E 10178666 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2295558**

54 Título: **Variantes de xilanasa**

30 Prioridad:

**08.03.2000 GB 0005585**

**27.06.2000 GB 0015751**

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

**27.02.2018**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**

**(100.0%)**

**Langebrogade 1**

**1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**SIBBESEN, OLE y**

**SOERENSEN, JENS FRISBAEK**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 656 440 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Variantes de xilanasas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a enzimas de mutantes de xilanasas que presentan una sensibilidad alterada a los inhibidores de xilanasas. La presente invención se refiere también al uso de estos enzimas de mutantes en el procesamiento de materiales vegetales.

**Antecedentes de la invención**

10 Durante muchos años, las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (referidas aquí como xilanasas) se han utilizado para la modificación de carbohidratos complejos derivados del material de la pared celular vegetal. Es bien conocido en la técnica que la funcionalidad de diferentes xilanasas (derivadas de diferentes microorganismos o plantas) difiere enormemente.

15 Se han hecho estudios completos que caracterizan la funcionalidad de la xilanasas sobre sustratos bien caracterizados y puros (Kormelink y colaboradores, 1992). Estos estudios muestran que diferentes xilanasas tienen diferentes requisitos específicos con respecto a la sustitución del esqueleto de xilosa del arabinoxilano (AX). Algunas xilanasas requieren tres restos de xilosa no sustituidos para hidrolizar el esqueleto de xilosa; otras requieren sólo una o dos. Las razones para estas diferencias en la especificidad se piensa que se deben a la estructura tridimensional dentro de los dominios catalíticos, que a su vez depende de la estructura primaria de la xilanasas, es decir, de la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la traducción de estas diferencias en las secuencias de aminoácidos en las diferencias en la funcionalidad de las xilanasas, no se ha documentado hasta ahora cuando la xilanasas actúa en un entorno complejo, tal como un material vegetal.

20 Los sustratos de xilanasas encontrados en el trigo (harina de trigo), se han dividido tradicionalmente en dos fracciones: los AX no extraíbles en agua (WU-AX) y los AX extraíbles en agua (WE-AX). La proporción WU-AX:WE-AX es aproximadamente 70:30 en la harina de trigo. Ha habido numerosas explicaciones de por qué hay dos fracciones diferentes de AX. La bibliografía más antigua (D'Appolonia and MacArthur (1976) y Montgomery y Smith (1955)) describe diferencias bastante altas en el grado de sustitución entre WE-AX y WU-AX. El grado de sustitución más alto se encontró en WE-AX. Esto se utilizó para explicar por qué algunas de las AX eran extraíbles. El alto grado de sustitución hizo el polímero soluble, en comparación con un grado de sustitución más bajo, que causaría enlaces de hidrógeno entre los polímeros y, en consecuencia, la precipitación.

25 La diferencia entre las funcionalidades de las diferentes xilanasas se ha pensado que se deba a las diferencias en la especificidad de la xilanasas y de este modo sus preferencias por los sustratos WU-AX o WE-AX.

En otras aplicaciones (por ejemplo panadería) es deseable producir polímeros solubles de alto peso molecular (HMW) a partir de la fracción WU-AX. Tales polímeros se han correlacionado con un aumento de volumen en la fabricación de pan (Rouau, 1993; Rouau y colaboradores, 1994 y Courtin y colaboradores, 1999).

35 En otras aplicaciones es deseable modificar el WU-AX de HMW, haciendo el peso molecular más bajo, reduciendo su efecto hidrocoloide y por lo tanto la unión de agua en el producto (galletas, separación de harina, etc).

Estas diferentes aplicaciones requieren diferentes funcionalidades de las xilanasas utilizadas para hacer el trabajo. Como se ha mencionado anteriormente, la diferencia en la funcionalidad se ha explicado mediante las diferentes especificidades del sustrato de las xilanasas.

40 El documento de Patente WO 00/39289 A describe un método para identificar y preparar variantes de xilanasas que muestran características mejoradas, por ejemplo, resistencia a un inhibidor de xilanasas, y su uso en aplicaciones de panadería.

**Compendio de la invención**

La presente invención proporciona un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasas de la Familia 11 a un inhibidor, cuyo método comprende:

45 (a) modificar uno o más restos de aminoácidos de dicho polipéptido;

en donde dichas modificaciones están en una cualquiera de las posiciones 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 o 175 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID NO. 1, o en una posición(es) equivalente(s) en otras xilanasas homólogas, en donde al menos una de dichas modificaciones de aminoácidos está al menos en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o en una posición(es) equivalente(s) en otras xilanasas homólogas;

50 (b) medir la sensibilidad de dicho polipéptido de xilanasas a un inhibidor de xilanasas; y

(c) medir el efecto de dicho polipéptido de xilanasa en la viscosidad de la suspensión de harina;

en donde dicho polipéptido o fragmento del mismo tiene una sensibilidad reducida a un inhibidor de xilanasa en comparación con la enzima de xilanasa parental; en donde además dicho polipéptido o fragmento del mismo disminuye la viscosidad de la suspensión de harina más que la enzima de xilanasa parental.

5 La presente invención proporciona también un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasa de la Familia 11 a un inhibidor cuyo método comprende:

(a) modificar dos o más restos de aminoácidos de dicho polipéptido;

10 en donde dichas modificaciones están en dos o más posiciones 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 175 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1, o en una posición(es) equivalente(s) en otras xilanasas homólogas;

en donde una de dichas modificaciones de aminoácido está en la posición 11;

(b) medir la sensibilidad de dicho polipéptido de xilanasa a un inhibidor de xilanasa; y

(c) medir el efecto de dicho polipéptido de xilanasa en la viscosidad de la suspensión de harina;

15 en donde dicho polipéptido o fragmento del mismo tiene una sensibilidad reducida a un inhibidor de xilanasa en comparación con la enzima de xilanasa parental; en donde además dicho polipéptido o fragmento del mismo disminuye la viscosidad de la suspensión de harina más que la enzima de xilanasa parental.

La presente invención proporciona también el uso de una variante de un polipéptido de xilanasa proporcionada mediante el método de la presente invención en un método para modificar los materiales vegetales.

20 La presente invención proporciona también el uso de una variante de un polipéptido de xilanasa proporcionada mediante el método de la presente invención en uno o más de: panadería, alimentación animal, producción de almidón, separación de harina (molienda húmeda) y, producción de papel y pasta.

La presente invención proporciona también el uso de una variante de un polipéptido de xilanasa proporcionado mediante el método de la presente invención en uno o más de: procesamiento de cereales, producción de almidón, alimentación animal, en procesamiento de la madera, mejora del proceso de blanqueo de pasta de madera.

25 La presente invención también proporciona el uso de una variante de un polipéptido de xilanasa proporcionado mediante el método de la presente invención para alterar la viscosidad derivada de la presencia de hemicelulosa o arabinoxilano en una solución o sistema que comprende material de la pared celular vegetal.

30 En contraste con estudios anteriores, hemos mostrado ahora que otros factores son más importantes en la determinación de la funcionalidad de la xilanasa que la especificidad del sustrato de las xilanasas determinado en sustratos puros bien caracterizados. Los datos presentados aquí muestran que los inhibidores de xilanasa endógenos dictan la funcionalidad de las xilanasas utilizadas actualmente en, por ejemplo, sistemas de harina de trigo. Esto significa que una xilanasa que normalmente modifica la WU-AX, aumentando la viscosidad del líquido de la masa en un sistema de harina de trigo, tiene una funcionalidad diferente si el inhibidor de xilanasa endógeno está ausente en la harina de trigo. Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que el diseño y aplicación de xilanasas no inhibidas, por ejemplo, utilizando mutagénesis dirigida al sitio podía ser una manera de imitar la ausencia de inhibidores de xilanasa en varios materiales vegetales, dando nuevas xilanasas con funcionalidad completamente nueva. Tales xilanasas podían ser muy eficaces en aplicaciones donde se requiere una reducción en la viscosidad. La xilanasa no inhibida actuaría rápidamente en la AX, y estaría influenciada principalmente por su actividad específica, antes que por los inhibidores endógenos. A partir de nuestros estudios, consideramos que es probable que los efectos inhibidores sean más importantes que la actividad específica. De hecho nuestros resultados muestran por primera vez que hay diferencias de 10 a 50 veces en los niveles de inhibición entre las xilanasas de la Familia 11.

45 Además, hemos continuado diseñando y probando una serie de xilanasas modificadas por mutagénesis dirigida al sitio para demostrar que las xilanasas se pueden producir para que presenten una sensibilidad reducida a los inhibidores de xilanasa presentes en los materiales vegetales. En particular, hemos identificado un número de restos en las xilanasas de la Familia 11 que influyen en el grado de inhibición de la xilanasa.

50 En consecuencia, será posible producir variantes de xilanasa que presenten una sensibilidad reducida a los inhibidores de xilanasa y por lo tanto una funcionalidad alterada. Esto permitirá, por ejemplo, una reducción en la cantidad de xilanasa requerida en un número de aplicaciones tales como alimentación animal, producción de almidón, panadería, separación de harina (molienda húmeda) y, producción de papel y pasta.

En consecuencia, la presente invención proporciona una variante de un polipéptido de xilanasa, o un fragmento de la misma que tiene actividad de xilanasa, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos de tal manera que

el polipéptido o fragmento del mismo presenta una sensibilidad alterada a un inhibidor de xilanasas en comparación con la enzima parental.

5 Aquí, la "enzima parental" es la enzima de xilanasas a partir de la que se deriva o es derivable la variante de la enzima de xilanasas. Con respecto al término "derivable", la variante no necesita necesariamente derivarse a partir de la enzima parental. En cambio, la variante se podía preparar, por ejemplo, mediante técnicas de ADN recombinante que utilizan secuencia(s) de nucleótidos que codifican dicha secuencia de la variante de xilanasas, es decir, la secuencia(s) de nucleótidos son similares a la secuencia(s) de nucleótidos mutados pero no se preparan por mutación de la secuencia(s) de nucleótidos parentales. Las variantes pueden prepararse incluso modificando químicamente una enzima parental.

10 Para algunas realizaciones la enzima parental es una enzima de tipo nativo. El término "tipo nativo" es un término de la técnica que entienden las personas expertas e incluye un fenotipo que es característico de la mayoría de los miembros de una especie que se produce de manera natural y que contrasta con el fenotipo de un mutante. Por lo tanto, en el presente contexto, la enzima de tipo nativo puede ser una forma de la enzima que se encuentra naturalmente en la mayoría de los miembros de las especies relevantes. Generalmente, la enzima de tipo nativo  
15 relevante en relación con las variantes de polipéptidos de la invención es la enzima de tipo nativo correspondiente más cercanamente relacionada en términos de homología de secuencia. Por ejemplo, para las xilanasas mutantes particulares descritas en los ejemplos, la enzima de tipo nativo correspondiente es la xilanasas A de *B. subtilis* de tipo nativo, más específicamente la xilanasas A de *B. subtilis* de tipo nativo publicada por Paice y colaboradores, 1986 y mostrada como SEQ. ID. 1. Sin embargo, donde una secuencia de tipo nativo particular se ha utilizado como base  
20 para producir un polipéptido de tipo nativo de la invención, esta será la secuencia de tipo nativo correspondiente, independientemente de la existencia de otra secuencia de tipo nativo que esté más próximamente relacionada en términos de homología de secuencia de aminoácidos.

25 Uno de nuestros sorprendentes hallazgos es que en nuestros estudios hasta ahora una mutación en el sitio activo de la xilanasas no tiene ningún efecto medible en la inhibición frente al inhibidor de xilanasas. Esto está en contraste directo con la mutación(es) que se producen fuera del sitio activo- dichas mutaciones se discutirán con más detalle a continuación.

En un aspecto preferido la modificación del aminoácido es de uno o más restos de aminoácidos de superficie.

En un aspecto más preferido la modificación del aminoácido es de uno o más restos accesibles al disolvente. Aquí, el disolvente es agua.

30 En un aspecto más preferido la modificación del aminoácido es de uno o más restos de superficie fuera del sitio activo.

En un aspecto altamente preferido la modificación del aminoácido es de uno o más restos de superficie fuera del sitio activo y que está/están al menos un 8% accesibles al disolvente. Aquí, el disolvente es agua.

35 En un aspecto altamente preferido la modificación del aminoácido es de uno o más restos de superficie fuera del sitio activo y que está/están al menos un 10% accesibles al disolvente. Aquí, el disolvente es agua.

La accesibilidad al disolvente se puede determinar utilizando Swiss-Pdb Viewer (versión 3.5b1), que se puede localizar a través de internet en <http://www.expasy.ch/spdbv/mainpage.html>. El Swiss-Pdb Viewer es presentado por Glaxo Wellcome Experimental Research.

Los aminoácidos de superficie de las enzimas xilanasas son determinables por una persona experta en la técnica.

40 A modo de ejemplo, la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* para la xilanasas A se muestra como SEQ. ID. NO. 1. Con respecto a esta secuencia, los restos de aminoácidos de superficie 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,  
45 Lys154-Gly157, Asn159-Leu160, Ser162-Trp164, Gln175, Ser177, Ser179, Asn181, Thr183, Trp185.

Como se indica, los aminoácidos de superficie de otras enzimas xilanasas (tales como xilanasas A de *Thermomyces lanuginosus*, cuya secuencia de nucleótidos codificante se presenta como SEQ. ID. NO. 9) son determinables por una persona experta en la técnica.

50 Por lo tanto, también se describe aquí una variante del polipéptido de xilanasas, o un fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, dicha variante del polipéptido de xilanasas o fragmento comprende una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera de los restos 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,

## ES 2 656 440 T3

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 de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o su/sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanas homólogos.

- 5 Como se describe aquí es una variante del polipéptido de xilanas, o fragmento del mismo que presenta actividad de xilanas, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera de los restos de aminoácidos números:

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

- 10 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanas homólogos.

Como se describe aquí es una variante del polipéptido de xilanas o un fragmento del mismo que presenta actividad de xilanas, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera de los restos de aminoácidos números 11, 12 y 13 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO.1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanas homólogos.

- 15 Ejemplos preferidos específicos de las modificaciones hechas se presentan aquí en la sección de Ejemplos.

También se describe aquí una variante del polipéptido de xilanas, o un fragmento del mismo que presenta actividad de xilanas, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera de los restos de aminoácidos números: 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 de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanas homólogos.

- 20 Por conveniencia, algunas veces nos referimos a los restos de aminoácidos números: 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 BAND 1.

- 25 En la Figura 1 se muestra la estructura en 3D de la xilanas de *B. subtilis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ. ID. NO. 1. BAND 1 se representa en la Figura 1 como la capa superior de la molécula y se extiende aproximadamente 13 Angstroms desde la parte superior de la molécula cuando la molécula está orientada como se muestra en la Figura 1. Band 1 termina con el resto Phe125 en el lado izquierdo cuando se ve la Figura 1 y con el resto Asn61 en el lado derecho cuando se ve la Figura 1.

- 30 Además, o de forma alternativa, para algunas realizaciones, preferiblemente la variante del polipéptido de xilanas, o el fragmento del mismo que presenta actividad de xilanas, comprende una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera de los restos de aminoácidos.

- 35 Preferiblemente dichas otras modificaciones deben ocurrir en uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos números: 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 de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanas homólogos.

- 40 Por conveniencia, algunas veces nos referimos a los restos de aminoácidos números: 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 de *B. subtilis* mostrada como BAND 2.

- 45 Preferiblemente dichas otras modificaciones deben ocurrir en uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos de superficie números: 3, 4, 5, 6, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 27, 43, 44, 56, 57, 58, 59, 60, 73, 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 de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1. o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanas homólogos.

- 50 Se describe aquí una variante del polipéptido de xilanas, o un fragmento del mismo que presenta actividad de xilanas, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos en BAND 1 y opcionalmente/o BAND 2 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* o sus posiciones equivalentes (bandas) en otros polipéptidos de xilanas homólogos. Por lo tanto, la modificación está en al menos BAND 1; pero podría estar sólo en BAND 2.

La variante del polipéptido de xilanas puede comprender otras modificaciones en otros restos de aminoácidos, tales como modificación en uno cualquiera de los restos 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 de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos homólogos.

5 La variante del polipéptido de xilanasa puede comprender otras modificaciones en los restos de aminoácidos de superficie, tales como una modificación en uno cualquiera de los restos de aminoácidos de superficie: 1, 2, 46, 47, 48, 49, 50, 52, 54, 95, 97, 99, 101, 102, 104, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 143, 145, 147, 148, 151, 154, 155, 156, 157, 185 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homólogos.

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

15 También se describe aquí una molécula de ácido nucleico (una secuencia de nucleótidos) que codifica un polipéptido de la invención. También se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención, opcionalmente unido operativamente a una secuencia reguladora capaz de dirigir la expresión de dichos ácidos nucleicos en una célula huésped adecuada. También se proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico o un vector descrito aquí.

También se describe aquí un método para preparar un polipéptido de la invención que comprende transformar una célula huésped con un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido, cultivar la célula transformada y expresar dicho polipéptido.

20 Nuestros resultados muestran que estas variantes de polipéptidos tienen mejores propiedades que las hacen adecuadas para una variedad de aplicaciones, tales como panadería, alimentación animal, producción de algodón, separación de harinas (molienda húmeda) y, producción de papel y pasta.

En consecuencia, la presente invención proporciona también el uso de una variante del polipéptido de la invención en un método para modificar materiales vegetales.

25 También se proporciona el uso de una variante de polipéptido de la invención en hornear. La invención proporciona además el uso de una variante del polipéptido de la invención en el procesamiento de cereales, producción de almidón y alimentación animal y el uso de una variante del polipéptido de la invención en el procesamiento de madera, por ejemplo en la mejora del blanqueamiento de la pasta de madera.

30 También se describe aquí un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasa a un inhibidor cuyo método comprende modificar uno o más restos de aminoácidos de dicha enzima seleccionados de los aminoácidos números 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 de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1, o los restos equivalentes en otros polipéptidos de xilanasa homólogos. Preferiblemente se reduce la sensibilidad.

35 Considerablemente, nuestros resultados muestran también por primera vez que los inhibidores de xilanasa juegan un importante papel en la determinación de la funcionalidad de las enzimas xilanasas en un sistema complejo, tal como un material vegetal. Por el término "funcionalidad", queremos decir las propiedades bioquímicas de la xilanasa en un sistema dado. Estas propiedades incluyen la especificidad del sustrato, los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{max}$  (donde corresponda) y la naturaleza de los productos de reacción obtenidos por la acción de la xilanasa en ese sistema. La funcionalidad también puede en consecuencia describirse en términos del efecto en las propiedades físicas y/o químicas de los materiales vegetales sobre los que actúa la xilanasa, por ejemplo la medida en que se altera la viscosidad del material.

40 De la misma manera que las variantes de xilanasa se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones de procesamiento, los inhibidores de xilanasa se pueden utilizar en una variedad de aplicaciones de procesamiento tales como panadería, procesamiento de la pasta de la madera y procesamiento de los cereales.

#### Descripción detallada de la invención

45 Aunque en general cualquier técnica molecular mencionada aquí es bien conocida en la técnica, se puede hacer una referencia en particular a Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989) y Ausubel y colaboradores, Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons. Inc.

#### A. Variantes de polipéptidos de xilanasa

50 Se han reportado enzimas xilanasas de casi 100 organismos diferentes, incluyendo plantas, hongos y bacterias. Las enzimas xilanasas se clasifican en varias de más de 40 familias de enzimas glicosil hidrolasas. Las enzimas glicosil hidrolasas, que incluyen xilanasas, mananasas, amilasas,  $\beta$ -glucanasas, celulasas, y otras carbohidrasas, se clasifican en base a propiedades tales como la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional y la geometría del sitio catalítico (Gilkes y colaboradores, 1991, Microbiol. Reviews 55: 303-315).

De particular interés para las aplicaciones de horneado son las enzimas clasificadas en la Familia 11. Todas éstas son xilanasas y se conocen como “xilanasas de la Familia 11”. Algunas publicaciones se refieren a éstas sinónimamente como xilanasas de la Familia G, pero el término “xilanasas de la Familia 11” se utilizará aquí para referirse a ambas xilanasas de la Familia G y Familia 11.

5 En la Tabla A se lista una serie 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 stercoarium XynA*, *Streptomyces lividans XynB*, y *Thermomonospora fusca XynA*) tienen una masa molecular más alta de 31.000 a 50.000 Da. Sin embargo, estas xilanasas tienen una secuencia central catalítica de aproximadamente 21.000 Da similar a la de las otras xilanasas de la Familia 11. Las secuencias de aminoácidos de las xilanasas de la Familia 11 (o, para las enzimas más grandes, el núcleo catalítico) muestran un alto grado de similitud, habitualmente con más del 40% de aminoácidos idénticos en una alineación de aminoácidos adecuada. Las xilanasas de la Familia 11, que son de origen bacteriano, de levadura, o fúngico, comparten la misma estructura molecular general.

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

15 Tabla A – xilanasas de la Familia 11

|  |   |
|--|---|
| <i>Aspergillus niger Xyn A</i>             | <i>Aspergillus kawachii Xyn C</i>       |
| <i>Aspergillus tubigensis Xyn A</i>        | <i>Bacillus circulans Xyn A</i>         |
| <i>Bacillus pumilus Xyn A</i>              | <i>Bacillus subtilis Xyn A</i>          |
| <i>Cellulomonas fimi Xyn D</i>             | <i>Chainia spp. Xyn</i>                 |
| <i>Clostridium acetobutylicum Xyn B</i>    | <i>Clostridium stercoarium Xyn A</i>    |
| <i>Fibrobacter succinogenes Xyn C</i>      | <i>Neocallimastix patriciarum Xyn A</i> |
| <i>Nocardiopsis dassonvillei Xyn II</i>    | <i>Ruminococcus flavefaciens Xyn A</i>  |
| <i>Schizophyllum commune Xyn</i>           | <i>Streptomyces lividans Xyn B</i>      |
| <i>Streptomyces lividans Xyn C</i>         | <i>Streptomyces sp. No. 36a Xyn</i>     |
| <i>Streptomyces thermoviolaceus Xyn II</i> | <i>Thermomonospora fusca Xyn A</i>      |
| <i>Trichoderma harzianum Xyn</i>           | <i>Trichoderma reesei Xyn I</i>         |
| <i>Trichoderma reesei Xyn II</i>           | <i>Trichoderma viride Xyn</i>           |

Variantes de xilanasas de la invención

Una variante del polipéptido de xilanasas de la invención se obtiene por modificación de un polipéptido de xilanasas sustituyendo, eliminando o añadiendo uno o más restos de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de xilanasas. Preferiblemente la modificación comprende una o mas sustituciones de aminoácidos. La modificación de las secuencias de polipéptidos se puede llevar a cabo utilizando técnicas estándar tales como la mutagénesis dirigida al sitio. La modificación puede ocurrir también mediante técnicas químicas – tales como la modificación química de uno o más restos de aminoácidos.

La secuencia de inicio puede ser una secuencia de tipo nativo o una secuencia que no se produce de modo natural, por ejemplo un derivado que se ha sometido ya a ingeniería de proteínas. La secuencia de xilanasas a modificar puede ser de cualquier origen, por ejemplo un origen bacteriano, fúngico o vegetal. Preferiblemente la secuencia de xilanasas a modificar es la de una xilanasas de la Familia 11, más preferiblemente una xilanasas de la Familia 11 seleccionada de *Trichoderma reesei xylanase I*, *Trichoderma reesei xylanase II*, *Trichoderma harzianum xylanase*, *Trichoderma viride xylanase*, *Bacillus circulans xylanase A*, *Bacillus subtilis xylanase A*, *Aspergillus niger xylanase A*, *Aspergillus kawachii xylanase C*, *Aspergillus tubigensis xylanase A*, *Streptomyces lividans xylanase B*, y *Streptomyces lividans xylanase C*.

En una realización particularmente preferida, la secuencia de xilanasas a modificar es la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o un homólogo de la misma. Preferiblemente dicho homólogo tiene al menos 40, 50, 60 o 80% de homología en al menos 50 o 100 restos de aminoácidos según se determina utilizando el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, U.S.A.; Devereux y colaboradores, 1984, Nucleic Acids Research 12: 387).

Modificaciones específicas de acuerdo con 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 basándose en la numeración de aminoácidos de la xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO.1, o los restos equivalentes en otros polipéptidos de xilanasas homólogos.

Sustituciones particularmente preferidas incluyen una o más de D11ΠY, D11ΠN, D11ΠF, D11ΠK, D11ΠS, D11ΠW, G12ΠF, G13ΠF, I15ΠK, N17ΠK, N17ΠY, N17ΠD, N29ΠK, N29ΠY, N29ΠD, S31ΠK, S31ΠY, S31ΠD, N32ΠK, G34ΠD, G34ΠF, G34ΠT, Y113ΠA, Y113ΠD, Y113ΠK, N114ΠA, N114ΠD, N114ΠF, N114ΠK, D119ΠK, D119ΠY, D119ΠN, G120ΠK, G120ΠD, G120ΠF, G120ΠY, G120ΠN, D121ΠN, D121ΠK, D121ΠF, D121ΠA, R122ΠD, R122ΠF, R122ΠA, T123ΠK, T123ΠY, T123ΠD, T124ΠK, T124ΠY, T124ΠD, Q175ΠE, Q175ΠS y Q175ΠL (con referencia a la secuencia de aminoácidos de la xilanasas de *B. subtilis*) o sus equivalentes en otros polipéptidos de xilanasas homólogos. Referencias adicionales a restos específicos de la xilanasas de *B. subtilis* mostrados como SEQ. ID. NO. 1 incluirán también sus equivalentes en otros polipéptidos de xilanasas homólogos.

Se puede llevar a cabo una combinación de mutaciones, por ejemplo mutaciones de dos o más de los restos anteriormente mencionados. Ejemplos de tales combinaciones se presentan aquí en la sección de Ejemplos.

En una realización adicional, las variantes de polipéptidos de la invención se pueden purificar y aislar de xilanasas mutantes naturales. Alternativamente, las xilanasas mutantes se pueden generar sometiendo organismos a mutágenos y después seleccionando individuos que comprendan mutaciones en sus genes de xilanasas. Los mutantes de origen natural y los mutantes generados mediante mutagénesis aleatoria pueden identificarse/seleccionarse utilizando una variedad de técnicas tales como cribado de PCR utilizando los cebadores de ácidos nucleicos adecuados para amplificar las regiones de los genes de xilanasas y secuenciar los fragmentos resultantes.

Así, las variantes de polipéptidos de la invención incluyen xilanasas mutantes de origen natural (purificados y aislados a partir de organismos en los que aparecen u obtienen de forma recombinante), xilanasas mutantes obtenidas mediante mutagénesis aleatoria y xilanasas mutantes obtenidas mediante mutagénesis dirigida al sitio.

Las variantes de polipéptidos de la invención se pueden someter también a modificaciones adicionales que no afectan necesariamente a la sensibilidad a los inhibidores, incluyendo cualquier sustitución de, variación de, modificación de, sustitución de, delección de o adición de uno (o más) aminoácidos de o a la secuencia que proporciona la secuencia del aminoácidos resultantes mantienen la actividad de xilanasas, preferiblemente que tienen al menos sustancialmente la misma actividad de xilanasas que la secuencia no modificada.

Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo de acuerdo con 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:

|               |                  |         |
|---------------|------------------|---------|
| ALIFÁTICO     | NO-POLAR         | G A P   |
|               |                  | I L V   |
|               | POLAR NO-CARGADO | C S T M |
|               |                  | N Q     |
| POLAR CARGADO | D E              |         |
|               | K R              |         |
| AROMÁTICO     |                  | H F W Y |

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

Los polipéptidos de la invención pueden comprender además secuencias de aminoácidos heterólogas, típicamente en el extremo N o en el extremo C, preferiblemente en el extremo N. Secuencias heterólogas pueden incluir secuencias que afectan a la dirección de proteínas intra o extracelular (tales como secuencias líderes).

Los polipéptidos de la invención se preparan típicamente por medios recombinantes, por ejemplo como se describe a continuación. Sin embargo, se pueden preparar también mediante métodos sintéticos utilizando técnicas bien conocidas por personas expertas tales como síntesis en fase sólida. Los polipéptidos de la invención pueden producirse también como proteínas de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación. Puede ser conveniente también incluir un sitio de escisión proteolítica entre la pareja de la proteína de fusión y la secuencia de proteínas de interés para permitir la eliminación de las secuencias de proteínas de fusión, tales como un sitio de escisión de trombina. Preferiblemente la proteína de fusión no impedirá la función de la secuencia de proteína de interés.

Se espera que el uso de las células huésped apropiadas proporcione modificaciones posteriores a la traducción que puedan ser necesarias para conferir la actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinantes de la invención.



Los polipéptidos de la invención pueden estar en una forma sustancialmente aislada. Se entenderá que la proteína se puede mezclar con vehículos o diluyentes que no interferirán con el propósito pretendido de la proteína y aún se considerarán sustancialmente aislados. Un polipéptido de la invención puede estar también en una forma sustancialmente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente la proteína en una preparación en la que más del 90%, por ejemplo 95%, 98% o 99% de la proteína en la preparación es un polipéptido de la invención.

Las variantes de polipéptidos de la invención tienen una sensibilidad alterada a los inhibidores de xilanasas en comparación con la secuencia de xilanasas parental que puede ser la correspondiente xilanasas de tipo nativo. Preferiblemente, las variantes de polipéptidos tienen una sensibilidad reducida a inhibidores de xilanasas. El término "sensibilidad alterada a inhibidores de xilanasas" significa que el grado en el que la actividad de endo- $\beta$ -1,4-xilanasas de una variante de polipéptido de la invención es inhibida por el inhibidor de xilanasas es diferente al de la enzima xilanasas parental – que puede ser la correspondiente xilanasas de tipo nativo. Preferiblemente, el grado en el que la variante del polipéptido es inhibido por el inhibidor es menor que el de la enzima xilanasas parental – que puede ser la proteína de tipo nativo. Esto puede deberse, por ejemplo, a un cambio en la estructura tridimensional de la variante del polipéptido de modo que el inhibidor ya no se une con la misma afinidad que lo hace la enzima xilanasas parental – que puede ser una enzima de tipo nativo.

La sensibilidad de las variantes de polipéptidos de la invención a inhibidores de xilanasas puede analizarse utilizando, por ejemplo, el ensayo descrito en el Ejemplo 4 y a continuación. Un inhibidor adecuado para su uso en el ensayo es el inhibidor purificado a partir de la harina de trigo en el Ejemplo 1. Otros inhibidores se describen a continuación.

#### Ensayo de xilanasas (actividad de Endo- $\beta$ -1,4-xilanasas)

Las muestras de xilanasas se diluyen en tampón de ácido cítrico (0,1 M) – hidrógeno fosfato de di-sodio (0,2 M), pH 5,0, para obtener aproximadamente OD = 0,7 en el ensayo final. Se termostatan tres diluciones de la muestra y un estándar interno con una actividad definida durante 5 minutos a 40°C. En el tiempo = 5 minutos, se añade 1 tableta de Xylazime (sustrato de xilano teñido y reticulado) a la solución de la enzima. En el tiempo = 15 minutos (o en algunos casos más, dependiendo de la actividad de xilanasas presente en la muestra) termina la reacción, añadiendo 10 ml de TRIS al 2%. La mezcla de reacción se centrifuga y se mide el OD del sobrenadante a 590 nm. Teniendo en cuenta las diluciones y la cantidad de xilanasas, la actividad (TXU, Total-Xylanase-Units) de la muestra puede calcularse con relación al estándar.

#### Inhibidores de xilanasas

Como se usa aquí, el término "inhibidor de xilanasas" se refiere a un compuesto, típicamente una proteína, cuyo papel es controlar la despolimerización de carbohidratos complejos, tales como arabinoxilano, que se encuentran en las paredes de las células vegetales. Estos inhibidores de xilanasas son capaces de reducir la actividad de las enzimas xilanasas de origen natural así como aquellas de origen fúngico o bacteriano. Aunque se ha informado de la presencia de inhibidores de xilanasas en semillas de cereales (véase por ejemplo McLauchlan y colaboradores 1999a; Rouau y Suget 1998) su impacto sobre la eficacia de las enzimas xilanasas no se ha examinado exhaustivamente.

McLauchlan y colaboradores (1999a) describen el aislamiento y la caracterización de una proteína de trigo que se une e inhibe dos xilanasas de la Familia 11. Asimismo, el documento de Patente WO 98/49278 demuestra el efecto de un extracto de harina de trigo en la actividad de un grupo de xilanasas microbianas, todas las cuales se clasifican como xilanasas de la Familia 11. Debyser y colaboradores (1999) describen también que las endoxilanasas de *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*, que son ambas miembros de las xilanasas de la Familia 11 se inhibieron por un inhibidor de xilanasas de trigo llamado TAXI. McLauchlan y colaboradores (1999b) muestran que los extractos de harinas comerciales tales como trigo, cebada, centeno y maíz son capaces de inhibir las xilanasas de las Familias 10 y 11.

El inhibidor de xilanasas puede ser cualquier inhibidor de xilanasas adecuado. A modo de ejemplo, el inhibidor de xilanasas puede ser el inhibidor descrito en el documento de Patente WO-A-98/49278 y/o el inhibidor de xilanasas descrito por Rouau, X. y Surget, A. (1998), McLauchlan, R. y colaboradores (1999) y/o el inhibidor de xilanasas descrito en la solicitud de Patente UK número 9828599.2 (presentada el 23 de Diciembre de 1998), la solicitud de Patente UK número 9907805.7 (presentada el 6 de Abril de 1999) y la solicitud de Patente UK número 9908645.6 (presentada el 15 de Abril de 1999).

#### Ensayo del inhibidor de xilanasas

Se mezclan 100  $\mu$ l de una fracción de un inhibidor candidato, 250  $\mu$ l de solución de xilanasas (que contiene 12 TXU de xilanasas microbiana/ml) y 650  $\mu$ l de tampón (tampón ácido cítrico 0,1M – hidrogeno fosfato di sódico 0,2M, pH 5,0). La mezcla se termostatiza durante 5 minutos a 40,0°C. En el tiempo = 5 minutos se añade una tableta de Xylazyme. En el tiempo = 15 minutos se termina la reacción por adición de 10 ml de TRIS al 2%. La mezcla de reacción se centrifuga (3.500g, 10 minutos, temperatura ambiente) y el sobrenadante se mide a 590 nm. La inhibición se calcula como actividad residual en comparación con el blanco. El blanco se prepara de la misma manera, excepto que los 100  $\mu$ l del inhibidor se sustituyen con 100  $\mu$ l de tampón (tampón ácido cítrico 0,1M – hidrogeno fosfato di sódico 0,2M, pH 5,0).

Inhibidor de xilanasas específico

5 Como se indicó, un inhibidor de xilanasas que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención es el inhibidor de xilanasas descrito en la solicitud de Patente UK número 9828599.2 (presentada el 23 de Diciembre de 1998), la solicitud de Patente UK número 9907805.7 (presentada el 6 de Abril de 1999) y la solicitud de Patente UK número 9908645.6 (presentada el 15 de Abril de 1999).

Este inhibidor de endo- $\beta$ -1,4-xilanasas endógeno se puede obtener a partir de harina de trigo. El inhibidor es un di péptido, que tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa (medido mediante SDS-PAGE o espectrometría de masas) y un pI de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5.

10 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 descritos en la técnica anterior también se pueden utilizar en ensayos para determinar la sensibilidad de una variante de polipéptido de la invención a los inhibidores de xilanasas. También se pueden utilizar como se describe a continuación para modular la funcionalidad de la xilanasas.

15 Polinucleótidos

20 Los polinucleótidos descritos aquí comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias de variantes de polipéptidos de la invención. Se entenderá por una persona experta que numerosos polinucleótidos diferentes pueden codificar el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, debe entenderse que las personas expertas pueden, utilizando técnicas rutinarias, hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia polipeptídica codificada por los polinucleótidos descritos aquí para reflejar el uso de codones de cualquier organismo huésped particular en el que los polipéptidos de la invención deben expresarse.

25 Los polinucleótidos descritos aquí pueden comprender ADN y ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Pueden ser también polinucleótidos que incluyen dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen varios tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos en la técnica. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, además de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que los polinucleótidos descritos aquí pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo para mejorar la actividad *in vivo* o la duración de la vida de los polinucleótidos descritos aquí.

30 Vectores y células huésped de nucleótidos

35 Los polinucleótidos descritos aquí pueden incorporarse en un vector recombinante replicable. El vector puede utilizarse para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Así también se describe aquí un método para preparar polinucleótidos descritos aquí introduciendo un polinucleótido como se describe aquí en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible, y cultivando la célula huésped bajo condiciones que provocan la replicación del vector. El vector puede recuperarse de la célula huésped. Células huésped adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura y hongos.

40 Preferiblemente, un polinucleótido descrito aquí en un vector está operativamente unido a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "operativamente unido" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia reguladora "operativamente unida" a una secuencia codificante se une de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control. El término "secuencias reguladoras" incluye promotores y potenciadores y otras señales reguladoras de la expresión.

45 El aumento de la expresión del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención se puede lograr también mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, promotor, líder de secreción y regiones terminadoras, que sirven para aumentar la expresión y, si se desea, los niveles de secreción de la proteína de interés del huésped de expresión elegido y/o para proporcionar el control inducible de la expresión del polipéptido de la invención.

50 Además del promotor nativo del gen que codifica el polipéptido de la invención, se pueden utilizar otros promotores para la expresión directa del polipéptido de la invención. El promotor se puede seleccionar por su eficacia para dirigir de la expresión del polipéptido de la invención en el huésped de expresión deseado.

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 su uso en huéspedes de expresión fúngica son los que se obtienen a partir de genes fúngicos de los promotores de xilanasas (*xlnA*), fitasa, ATP-

sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), alcohol deshidrogenasa (*AdhA*),  $\alpha$ -amilasa (*amy*), amiloglucosidasa (AG – del gen *glaA*), acetamidasa (*amdS*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*).

Ejemplos de promotores de levadura fuertes son los que se obtienen a partir de los genes de alcohol deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato kinasa y trifosfato isomerasa.

- 5 Ejemplos de promotores bacterianos fuertes son los promotores de  $\alpha$ -amilasa y *SP02* así como los promotores de los genes de proteasa extracelular.

También se pueden utilizar promotores híbridos para mejorar la regulación inducible del constructo de expresión.

A menudo, es deseable que el polipéptido de la invención se secrete del huésped de expresión en el medio de cultivo de donde el polipéptido de la invención se recupera más fácilmente. La secuencia líder de secreción nativa del polipéptido de la invención se puede utilizar para efectuar la secreción del polipéptido expresado de la invención. Sin embargo, un aumento en la expresión del polipéptido de la invención resulta algunas veces en la producción de la proteína en niveles más allá de los que el huésped de expresión es capaz de procesar y secretar, creando un cuello de botella tal que el producto de proteína se acumula dentro de la célula. Por consiguiente, también se describe aquí secuencias líderes heterólogas para proporcionar la secreción más eficiente del polipéptido de la invención del huésped de expresión elegido.

El líder de secreción se puede seleccionar en base al huésped de expresión deseado. Se puede elegir un líder de secreción heterólogo que sea homólogo a las otras regiones reguladoras del constructo de expresión. Por ejemplo, el líder de la proteína amiloglucosidasa (AG) altamente secretada se puede utilizar en combinación con el promotor de la amiloglucosidasa (AG) en sí, así como en combinación con otros promotores. Las secuencias de señal híbridas se pueden utilizar también con el contexto de la presente invención.

Ejemplos de secuencias líderes de secreción heterólogas preferidas son aquellas que se originan a partir del gen de amiloglucosidasa (AG) fúngica (*glaA* – ambas versiones de 18 y 24 aminoácidos por ejemplo de *Aspergillus*), el gen del factor  $\alpha$  (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o el gen de  $\alpha$ -amilasa (*Bacillus*).

Tales vectores pueden transformarse en una célula huésped adecuada como se describió anteriormente para proporcionar la expresión de un polipéptido de la invención. Por tanto, se describe también aquí un proceso para preparar polipéptidos de acuerdo con la invención que comprende cultivar una célula huésped transformada o transfectada con un vector de expresión como se describió anteriormente bajo condiciones para proporcionar la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifique los polipéptidos, y recuperar los polipéptidos expresados. Células huésped adecuadas incluyen, por ejemplo, células fúngicas, tales como *Aspergillus* y células de levadura, tales como células de levadura del género *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*. Otras células huésped adecuadas se discuten a continuación.

Los vectores pueden ser por ejemplo, plasmidos, virus o fagos provistos de 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 adecuados para microorganismos industriales son los formados por el grupo de marcadores de selección que no requieren una mutación en el organismo huésped. Ejemplos de marcadores de selección fúngicos son los genes para acetamidasa (*amdS*), ATP sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), orotidina-5'-fosfatodescarboxilasa (*pvrA*), fleomicina y resistencia al benomil (*benA*). Ejemplos de marcadores de selección no fúngicos son el gen de resistencia bacteriano G418 (este puede utilizarse también en levaduras, pero no en hongos), el gen de resistencia a ampicilina (*E. coli*), el gen de resistencia a neomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA* de *E. coli*, que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de RNA o utilizado para transfectar o transformar una célula huésped.

También se describe aquí células huésped transformadas o transfectadas con un polinucleótido descrito aquí. Preferiblemente dicho polinucleótido se lleva en un vector para la replicación y expresión de dicho polinucleótido. Las células se escogerán para ser compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, levadura o células vegetales.

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

50 Dependiendo de la naturaleza del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención, y/o la conveniencia de un procesamiento adicional de la proteína expresada, pueden preferirse los huéspedes eucarióticos tales como levaduras u hongos. En general, las células de levadura se prefieren sobre las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son pobremente secretadas de la célula de levadura, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en levaduras). En estos casos, se seleccionaría un organismo huésped fúngico.

Se puede elegir también un huésped heterólogo en el que el polipéptido de la invención se produce en una forma en la que está sustancialmente libre de otras xilanasas. Esto se puede lograr eligiendo un huésped que no produzca normalmente tales enzimas.

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

10 Huéspedes de expresión particularmente preferidos pueden seleccionarse de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *tubigenis*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

La producción del polipéptido de la invención se puede efectuar mediante el cultivo de huéspedes de expresión microbiana, que han sido transformados con uno o más polinucleótidos descritos aquí, en un medio de fermentación de nutrientes convencional.

15 El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contiene una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa, maltosa, molasa, etc.), una fuente de nitrógeno (por ejemplo, sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc.), una fuente de nitrógeno orgánica (por ejemplo, extracto de levadura, extracto de malta, peptona, etc.) y fuentes de nutrientes inorgánicos (por ejemplo, fosfato, magnesio, potasio, zinc, hierro, etc.). Opcionalmente, se puede añadir un inductor.

20 La selección de un medio apropiado puede basarse en la elección de los huéspedes de expresión y/o basarse en los requisitos reguladores del constructo de expresión. Tales medios son bien conocidos por los expertos en la técnica. El medio puede, si se desea, contener componentes adicionales que favorecen a los huéspedes de expresión transformados sobre otros microorganismos potencialmente contaminantes.

25 Después de la fermentación, las células se pueden eliminar del caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Después de la eliminación de las células, la variante del polipéptido de la invención puede entonces recuperarse, si se desea, purificarse y aislarse por medios convencionales.

#### Organismos

30 El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína de la variante de xilanasas de acuerdo con la presente invención y/o los productos obtenidos de la misma, en donde una secuencia reguladora de la transcripción puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos descrita aquí cuando está presente en el organismo. Organismos adecuados pueden incluir un procarionta, hongo, levadura o planta. Para el aspecto de la xilanasas de la presente invención, una bacteria puede ser un organismo preferible, preferiblemente del género *Bacillus*, más preferiblemente *Bacillus subtilis*.

35 El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de acuerdo con la presente invención y/o los productos obtenidos de la misma, en donde la secuencia reguladora de la transcripción puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos descrita aquí dentro del organismo. Preferiblemente la secuencia de nucleótidos se incorpora en el genoma del organismo.

40 El término "organismo transgénico" no cubre las secuencias de codificación de nucleótidos nativos en su medio natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que está también en su entorno natural.

45 Por lo tanto, el organismo transgénico descrito aquí incluye un organismo que comprende una cualquiera de, o combinaciones de, las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la presente invención, constructos como se describen aquí (incluyendo combinaciones de los mismos), vectores como se describen aquí, plásmidos como se describen aquí, células como se describen aquí, tejidos como se describen aquí o los productos de los mismos. La célula o el organismo transformado podrían preparar cantidades aceptables del compuesto deseado que sería fácilmente recuperable a partir de la célula u organismo.

#### Transformación de células huésped/organismos huésped

50 Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las enseñanzas sobre la transformación de huéspedes procarióticos están bien documentadas en la técnica, véase por ejemplo Sambrook y colaboradores (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel y colaboradores, Short Protocols in Molecular Biology (1999), 4th Ed., John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un huésped procariótico entonces puede ser necesario modificar adecuadamente la secuencia de nucleótidos antes de la transformación – tal como por la eliminación de intrones.

Como se mencionó anteriormente, un organismo de huésped preferido es del género *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*.

5 El organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, las levaduras se han utilizado también ampliamente como un vehículo para la expresión de genes heterólogos. Las especies *Saccharomyces cerevisiae* tienen una larga historia de uso industrial, incluyendo su uso para la expresión de genes heterólogos. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido reportada por Goodey y colaboradores (1987, *Yeast Biotechnology*, D R Berry y colaboradores, eds, pp 401-429, Allen and Unwin, London) y por King y colaboradores (1989, *Molecular and Cell Biology of Yeast*, E F Walton and G T Tarronton, eds, pp 107-133, Blackie, Glasgow).

10 Por varias razones *Saccharomyces cerevisiae* es muy adecuado para la expresión de genes heterólogos. En primer lugar, no es patogénico para humanos y es incapaz de producir ciertas endotoxinas. En segundo lugar, tiene una larga historia de uso seguro después de siglos de explotación comercial para varios propósitos. Esto ha llevado a una amplia aceptación pública. En tercer lugar, la extensa utilización comercial y la investigación dedicada al organismo ha dado como resultado una riqueza de conocimientos sobre la genética y la fisiología así como las características de fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

Una revisión de los principios de la expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de los productos génicos es dada por E Hinchcliffe E Kenny (1993, "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, Vol 5, Anthony H Rose and J Stuart Harrison, eds, 2nd edition, Academic Press Ltd.).

20 Están disponibles varios tipos de vectores de levadura, incluyendo vectores integradores, que requieren la recombinación con el genoma del huésped para su mantenimiento, y vectores plasmídicos de replicación autónoma.

Para preparar el *Saccharomyces* transgénico, los constructos de expresión se preparan insertando la secuencia de nucleótidos descrita aquí en un constructo diseñado para la expresión en levaduras. Se han desarrollado varios tipos de constructos utilizados para la expresión heteróloga. Los constructos contienen un promotor activo en la levadura unido a la secuencia de nucleótidos descrita aquí, por lo general se utiliza un promotor de origen levadura, tal como el promotor GAL 1. Por lo general se utiliza una secuencia de señal de origen levadura, tal como la secuencia que codifica el péptido de señal SUC2. Un terminador activo en la levadura finaliza el sistema de expresión.

30 Para la transformación de levaduras se han desarrollado varios procedimientos de transformación. Por ejemplo, un *Saccharomyces* transgénico como se describe aquí se puede preparar siguiendo las enseñanzas de Hinnen y colaboradores (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, London, 275, 104); y Ito, H y colaboradores (1983, *J Bacteriology* 153, 163-168).

35 Las células de levadura transformadas se seleccionan utilizando varios marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación están un número de marcadores auxotróficos tales como LEU2, HIS4 y TRP1; y marcadores de resistencia a antibióticos dominantes tales como marcadores de antibiótico aminoglicósido, por ejemplo G418.

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

40 Una planta transgénica como se describe aquí se puede producir a partir de cualquier planta tal como las plantas con semillas (angiospermas), y coníferas. Las angiospermas incluyen dicotiledóneas y monocotiledóneas. Ejemplos de plantas dicotiledóneas incluyen tabaco (*Nicotiana plumbaginifolia* y *Nicotiana tabacum*), *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Brassica nigra*, *Datura innoxia*, *Vicia narbonensis*, *Vicia Faba*, guisante (*Pisum sativum*), coliflor, clavel y lenteja (*Lens culinaris*). Ejemplos de plantas monocotiledóneas incluyen cereales tales como trigo, cebada, avena y maíz.

45 Las técnicas para producir plantas transgénicas son bien conocidas en la técnica. Típicamente, cualquiera de las plantas completas, células o protoplastos se pueden transformar con un constructo de ácido nucleico adecuado que codifica una molécula de dedo de zinc o el ADN objetivo (véase anteriormente para ejemplos de constructos de ácidos nucleicos). Hay muchos métodos para introducir la transformación de los constructos de ADN en las células, pero no todos son adecuados para administrar ADN a las células vegetales. Métodos adecuados incluyen la infección por *Agrobacterium* (véase, entre otros, Turpen y colaboradores, 1993, *J. Virol. Methods*, 42: 227-239) o el suministro directo del ADN tal como, por ejemplo, por transformación mediada por PEG, por electroporación o por aceleración de las partículas de ADN recubiertas. Los métodos de aceleración son generalmente preferidos e incluyen, por ejemplo, bombardeo de microproyectiles. Un procedimiento típico para producir plantas transgénicas (en particular monocotiledónea), tomado del documento de Patente U. S. No. 5.874.265, se describe a continuación.

55 Un ejemplo de un método para suministrar segmentos de ADN transformante a células vegetales es el bombardeo de microproyectiles. En este método, las partículas no biológicas pueden recubrirse con ácidos nucleicos y se

suministran a las células mediante una fuerza propulsora. Partículas ejemplares incluyen las que comprenden tungsteno, oro, platino, y similares.

5 Una ventaja particular del bombardeo de microproyectiles, además de que sea un medio eficaz de transformación reproduciblemente estable tanto de dicotiledóneas como monocotiledóneas, es que no se requiere ni el aislamiento de protoplastos ni la susceptibilidad de infección por *Agrobacterium*. Una realización ilustrativa de un método para el suministro de ADN a las células vegetales mediante aceleración es un Sistema de Suministro de Partículas Biolísticas, que se puede utilizar para propulsar las partículas recubiertas con ADN a través de una pantalla, tal como una pantalla de acero inoxidable o Nytex, sobre una superficie de filtro recubierta con células vegetales cultivadas en suspensión. La pantalla dispersa las partículas de tungsteno con ADN de modo que no se suministren a las células receptoras en grandes agregados. Se cree que sin una pantalla que intervenga entre el aparato de proyectiles y las células que se van a bombardear, se agregan los proyectiles y pueden ser demasiado grandes para alcanzar una frecuencia alta de transformación. Esto puede ser debido al daño inflingido en las células receptoras por los proyectiles que son demasiado grandes.

15 Para el bombardeo, las células en suspensión se concentran preferiblemente en filtros. Los filtros que contienen las células que se van a bombardear se colocan a una distancia apropiada debajo de la placa de parada del macroproyectil. Si se desea, una o más pantallas se colocan también entre la pistola y las células que van a bombardear. A través del uso de las técnicas expuestas aquí se pueden obtener hasta 1.000 o más grupos de células que expresan transitoriamente un gen marcador ("focos") en el filtro bombardeado. El número de células en un foco que expresa el producto del gen exógeno 48 horas después del bombardeo oscila a menudo de 1 a 10 y un promedio de 2 a 3.

Después de efectuar el suministro del ADN exógeno a las células receptoras por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, una etapa preferida es identificar las células transformadas para el cultivo adicional y la regeneración de la planta. Esta etapa puede incluir el ensayo de cultivos directamente para un rasgo identificable o mediante la exposición de los cultivos bombardeados a un agente o agentes selectivos.

25 Un ejemplo de un rasgo marcador identificable es el pigmento rojo producido bajo el control del locus R en el maíz. Este pigmento se puede detectar mediante el cultivo de células en un soporte sólido que contiene un medio nutriente capaz de soportar el crecimiento en esta etapa, la incubación de las células a, por ejemplo, 18°C y mayor que 180  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , y la selección de células de colonias (agregados visibles de células) que están pigmentadas. Estas células se pueden cultivar además, o en suspensión o en medio sólido.

30 Una realización ejemplar de métodos para identificar las células transformadas implica exponer los cultivos bombardeados a un agente selectivo, tal como un inhibidor metabólico, un antibiótico, herbicida o similares. Las células que se han transformado y que han integrado de forma estable un gen marcador que confiere resistencia al agente selectivo utilizado, crecerán y se dividirán en el cultivo. Las células sensibles no serán susceptibles a un cultivo adicional.

35 Para utilizar el sistema selectivo de barras de bialafós, las células bombardeadas en los filtros se resuspenden en un medio líquido no selectivo, cultivan (por ejemplo, durante una a dos semanas) y transfieren a filtros superpuestos en un medio sólido que contiene de 1-3 mg/l de bialafós. Aunque típicamente se prefieren intervalos de 1-3 mg/ml, se propone que intervalos de 0,1-50 mg/l encontrarán utilidad en la práctica de la invención. El tipo de filtro para su uso en el bombardeo se cree que no es particularmente crucial, y puede comprender cualquier soporte sólido, poroso, inerte.

Las células que sobreviven a la exposición al agente selectivo se pueden cultivar en un medio que soporta la regeneración de las plantas. El tejido se mantiene en un medio básico con hormonas durante aproximadamente 2-4 semanas, después se transfieren a un medio sin hormonas. Después de 2-4 semanas, el desarrollo de los brotes señalará el tiempo para transferirlo a otro medio.

45 La regeneración requiere típicamente una progresión del medio cuya composición se ha modificado para proporcionar los nutrientes apropiados y las señales hormonales durante las etapas de desarrollo secuenciales desde el callo transformado a las plantas más maduras. Las plántulas en desarrollo se transfieren al suelo, y se endurecen, por ejemplo, en una cámara de ambiente controlado a aproximadamente 85% de humedad relativa, 600 ppm de  $\text{CO}_2$ , y 250  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz. Las plantas se maduraron preferiblemente o en una cámara de crecimiento o de efecto invernadero. La regeneración llevará normalmente aproximadamente de 3-12 semanas. Durante la regeneración, las células se cultivan en un medio sólido en recipientes de cultivo de tejidos. Una realización ilustrativa de tales recipientes es una placa Petri. Las plantas que se regeneran son preferiblemente cultivadas a aproximadamente 19°C a 28°C. Después de que las plantas que se regeneran han alcanzado la etapa de lanzamiento y el desarrollo de la raíz, se pueden transferir a un invernadero para un mayor crecimiento y ensayo.

55 El ADN genómico se puede aislar de líneas celulares de callos y plantas para determinar la presencia de los genes exógenos mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica tales como PCR y/o transferencia de Southern.

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

- 5 Por tanto, también se describe aquí un sistema de vectores que lleva un constructo que codifica una variante del polipéptido de xilanasa de acuerdo con la presente invención y que es capaz de introducir el constructo en el genoma de la planta.

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

Un sistema empleado ampliamente para la transformación de células vegetales con un promotor dado o una secuencia de nucleótidos o un constructo se basa en la utilización de un plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* o un plásmido Ri de *Arobacterium 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 y J.P. Helgeson, 203-208).

Se han construido varios plásmidos Ti y Ri diferentes que son adecuados para la construcción de los constructos de plantas o células vegetales descritos anteriormente.

#### B. Usos

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

25 Específicamente, una variante de xilanasa de la invención se puede utilizar en el procesamiento de materiales vegetales para su uso como productos alimenticios, tales como alimentación animal, en la producción de almidón, en el horneado y en el procesamiento de la pasta de madera para fabricar papel.

#### Preparación de productos alimenticios

30 Una variante de xilanasa de la invención se puede utilizar para procesar materiales vegetales tales como cereales que se utilizan en los productos alimenticios incluyendo alimentación animal. Como se usa aquí, el término "cereal" significa cualquier tipo de grano utilizado para la alimentación y/o cualquier tipo de hierba que produzca este grano tal como pero no limitado a uno cualquiera de trigo, trigo molido, cebada, maíz, sorgo, centeno, avena, triticale y arroz o combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el cereal es un cereal de trigo.

El xilano en la alimentación y/o suplemento alimenticio se modifica al poner en contacto el xilano con la variante de xilanasa de la presente invención.

35 Como se usa aquí, el término "poner en contacto" incluye pero no se limita a pulverizar, recubrir, impregnar o estratificar el alimento y/o suplemento alimenticio con la variante de la enzima xilanasa de la presente invención.

40 Los alimentos y/o suplementos alimenticios descritos aquí se pueden preparar mezclando la variante de la enzima xilanasa directamente con el alimento y/o suplemento alimenticio. A modo de ejemplo, la variante de la enzima xilanasa puede ponerse en contacto (por ejemplo, por pulverización) en un alimento y/o suplemento alimenticio a base de cereales tales como trigo molido, maíz o harina de soja.

45 Es posible incorporar también la enzima de la variante de xilanasa en un segundo (y diferente) alimento y/o suplemento alimenticio o agua potable que se añade después al alimento y/o suplemento alimenticio descrito aquí. Por consiguiente, no es esencial que la enzima de la variante de xilanasa proporcionada por la presente invención se incorpore en el alimento y/o suplemento alimenticio basado en cereales por sí mismo, aunque tal incorporación forma un aspecto particularmente preferido.

50 El alimento y/o suplemento alimenticio se puede combinar con otros componentes del alimento y/o suplemento alimenticio para producir un alimento y/o suplemento alimenticio basado en cereales. Tales otros componentes de alimentos y/o suplementos alimenticios pueden incluir uno u otros más (preferiblemente termoestables) suplementos de enzimas, alimentos y/o suplementos alimenticios con vitaminas, alimentos y/o suplementos alimenticios con minerales y alimentos y/o suplementos alimenticios con aminoácidos. El alimento y/o suplemento alimenticio resultante (combinado) que comprende posiblemente varios tipos diferentes de compuestos puede después mezclarse en una cantidad apropiada con los otros componentes del alimento y/o suplemento alimenticio tales como suplementos de cereales y proteínas para formar un alimento humano y/o alimento animal.

El alimento y/o suplemento alimenticio descrito aquí se puede preparar mezclando diferentes enzimas que tienen las actividades apropiadas para producir una mezcla de enzimas. A modo de ejemplo, un alimento y/o suplemento alimenticio basado en cereales formado a partir, por ejemplo, de trigo molido o maíz se pueden poner en contacto (por ejemplo, por pulverización) o simultáneamente o secuencialmente con la enzima xilanasa y otras enzimas que tienen actividades apropiadas. Estas enzimas pueden incluir pero no se limitan a una cualquiera o más de una amilasa, una glucoamilasa, una mananasa, una galactosidasa, una fitasa, una lipasa, una glucanasa, una arabinofuranosidasa, una pectinasa, una proteasa, una glucosa oxidasa, una hexosa oxidasa y una xilanasa. Las enzimas que tienen las actividades deseadas pueden, por ejemplo, mezclarse con la xilanasa de la presente invención o antes de poner en contacto estas enzimas con el alimento y/o suplemento alimenticio basado en cereales o alternativamente tales enzimas se pueden poner en contacto simultáneamente o secuencialmente con dicho suplemento a base de cereales. El alimento y/o suplemento alimenticio se mezcla a su vez con un alimento y/o suplemento alimenticio basado en cereales para preparar el alimento y/o suplemento alimenticio final. También es posible formular el alimento y/o suplemento alimenticio como una solución de las actividades de la enzima individual y mezclar después esta solución con un alimento y/o material alimenticio anterior para procesar el alimento y/o suplemento alimenticio en granos o como un puré.

#### Productos de panadería

La presente invención proporciona el uso de una variante del polipéptido de xilanasa de la invención en un proceso para preparar productos alimenticios. Productos de panadería típicos (horneados) de acuerdo con la presente invención incluyen pan – tales como panes, rollos, bollos, bases de pizza, etc.- galletas saladas, tortillas, pasteles, galletas, bizcochos, galletitas de agua, etc. La preparación de los productos alimenticios tales como los productos de panadería es bien conocida en la técnica. La producción de masa, por ejemplo, se describe en el Ejemplo 2. El uso de las variantes de xilanasas de la invención para alterar la viscosidad de una suspensión de harina se describe en el Ejemplo 5.

#### Producción de almidón

Una variante de xilanasa de la invención se puede utilizar también en la producción de almidón a partir de materiales vegetales derivados de cereales y tubérculos tales como patatas.

#### Procesamiento de la pasta de madera

Una variante de xilanasa de la invención puede utilizarse también en el procesamiento de la pasta de madera, por ejemplo en la preparación del papel.

Como se describió anteriormente, hemos mostrado que un importante determinante de la funcionalidad de la xilanasa es la presencia de inhibidores endógenos en el material vegetal. Por consiguiente, aunque un método para alterar la funcionalidad de la xilanasa es modificar una xilanasa para cambiar su sensibilidad a inhibidores endógenos, otro método sería variar la cantidad y/o tipo del inhibidor presente en el material vegetal. Por tanto, también se describe aquí el uso de un inhibidor de xilanasa para alterar la funcionalidad de una xilanasa y por consiguiente el uso de un inhibidor de xilanasa en los métodos de procesamiento de materiales vegetales descritos anteriormente.

La presente invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos que están destinados a ser sólo ilustrativos y no limitantes.

#### Ejemplos

Ejemplo 1 – Purificación y caracterización del inhibidor de xilanasa endógeno de trigo.

2 Kg de harina de trigo (Danish Reform, lote 99056) se extrajeron con agua, utilizando una proporción harina:agua de 1:2, durante 10 minutos de agitación. El inhibidor de xilanasa endógeno soluble se separó de la suspensión de harina-agua por centrifugación. La extracción y la centrifugación se llevó a cabo a 4°C. El inhibidor se purificó a partir del extracto acuoso mediante las siguientes técnicas cromatográficas y técnicas de concentración: HPLC-SEC, HPLC-CIEC, evaporación rotatoria, HPLC-HIC, HPLC-SEC y evaporación rotatoria. El inhibidor de xilanasa podría monitorizarse y cuantificarse durante la purificación, utilizando 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 disminuye 1 TXU a 0,5 TXU bajo las condiciones descritas a continuación.*

La xilanasa utilizada en este ensayo es la xilanasa de tipo nativo de *Bacillus subtilis*.

250 µl de solución de xilanasa que contiene 12 TXU/ml, aproximadamente 100 µl de solución de inhibidor de xilanasa y tampón de ácido cítrico (0,1 M) - hidrogeno fosfato di sódico (0,2 M), pH 5, para hacer reaccionar un volumen de reacción de 1.000 µl se preincuba durante 5 minutos a 40°C. A un t = 5 minutos, 1 tableta de Xilazyme (Megazyme, Ireland) se añade a la mezcla de reacción. A un t = 15 minutos se termina la reacción mediante la





Pruebas de horneado

5 Se hicieron pruebas de horneado con (1,44 x nivel de inhibidor inicial en la harina Danish Reform, lote No. 99056) y sin la adición del inhibidor de xilanasa endógeno purificado a la harina reconstituida, respectivamente. Las pruebas de horneado se hicieron utilizando las xilanasas enumeradas en la Tabla 2 y las composiciones enumeradas en la Tabla 3.

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

| Masa No. | ID            | TXU   | Inh. Añadido, XIU/50g |
|----------|---------------|-------|-----------------------|
| 1        | Control       | 0     | 0                     |
| 2        | <i>B. sub</i> | 7.500 | 0                     |
| 3        | <i>A. nig</i> | 7.500 | 0                     |
| 4        | <i>B. sub</i> | 7.500 | 850                   |
| 5        | <i>A. nig</i> | 7.500 | 850                   |
| 6        | Control       | 0     | 850                   |

Análisis de la masa

La masa se analizó con respecto a:

Adherencia

10 La adherencia de la masa se midió en un sistema TX-XT2 (Stable Micro Systems) utilizando una célula de adherencia de la masa SMS de acuerdo con el método descrito por Chen And Hosney (Lebensmittel Wiss u.-Technol., 28, 467-473. 1995).

Análisis de viscosidad del líquido de la masa

15 La viscosidad del líquido de la masa extraído se midió utilizando un viscosímetro Brookfield después de la extracción.

Análisis de pentosán del líquido de la masa

El pentosán solubilizado se midió en el líquido de la masa utilizando el método de Rouau y Surget (Carbohydrate polymers, 24, 123-132, 1994).

**Resultados**

20 Fraccionamiento y reconstitución de harina

El fraccionamiento y la reconstitución de la masa dieron como resultado 168,15 gramos de gluten liofilizado, 111,13 gramos de fracción soluble liofilizada y 1.143,56 gramos de almidón liofilizado.

Cuantificación del inhibidor en la harina

25 Utilizando el método de cuantificación del inhibidor, se pudo detectar el nivel de inhibidor en la harina 99056 y en la harina reconstituida. Los resultados de estos análisis se enumeran en la Tabla 4.

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 de inhibidor en las dos porciones de harina, se muestra un descenso del 93% (100 – (42XIU/590XIU) x 100%) del nivel de inhibidor en la harina reconstituida.

Pruebas de horneado

30 Los resultados de las pruebas de horneado se enumeran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Datos de las pruebas de horneado con harina reconstituida, xilanasa y +/- adición del inhibidor de xilanasa. Desviación estándar, %, representa la desviación estándar durante dos días de horneado.

| ID            | TXU   | Inh., XIU/50 g | Promedio espec. Vol, ml/gr | Desviación estándar, % |
|---------------|-------|----------------|----------------------------|------------------------|
| Control       | 0     | 42             | 3,04                       | 4,06                   |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 42             | 3,23                       | 12,41                  |
| <i>A. nig</i> | 7.500 | 42             | 3,44                       | 5,24                   |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 850            | 3,22                       | 4,26                   |
| <i>A. sub</i> | 7.500 | 850            | 3,38                       | 0,70                   |
| Control       | 0     | 850            | 2,94                       | 0,05                   |

5 La desviación estándar mostrada en la Tabla 5 refleja las propiedades de manejo de la masa de la masa probada. La masa preparada sin el inhibidor de xilanasa endógeno (42 XIU), fue muy difícil de manejar. La desviación estándar para estas masas está en el área del 3 al 12,5%. Comparado con la masa con el inhibidor añadido, ésta es bastante alta. Si estas desviaciones estándar se comparan con los cambios reales en el volumen del pan, puede verse que las cifras muestran aproximadamente el mismo valor. Esto significa que no podemos concluir nada sobre la ausencia de la influencia del inhibidor en el volumen del pan. Si observamos la masa preparada con la adición de el inhibidor de xilanasa endógeno (850 XIU) en la Tabla 5, podemos ver que pudimos preparar pan a partir de harina reconstituida de forma reproducible durante un periodo de dos días.

10 La desviación estándar estuvo dentro del área de 0,05 a 4,2 %, que es aceptable. De la Tabla 6 se puede ver que, todas las xilanasas aumentaron el volumen del pan horneado.

Tabla 6. Incremento del volumen en el pan horneado a partir de harina reconstituida como una función de la adición de xilanasa e inhibidor de xilanasa.

| ID            | TXU   | Inh., XIU/50 g | Promedio espec. Vol, ml/gr | Incremento de volumen como función de xilanasa, % |
|---------------|-------|----------------|----------------------------|---|
| Control       | 0     | 42             | 3,04                       | 0,0   |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 42             | 3,23                       | 6,2   |
| <i>A. nig</i> | 7.500 | 42             | 3,44                       | 13,3  |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 850            | 3,22                       | 9,7   |
| <i>A. sub</i> | 7.500 | 850            | 3,38                       | 15,0  |
| Control       | 0     | 850            | 2,94                       | 0,0   |

15 Lo que puede deducirse de la Tabla 5 y la Tabla 6, es que la ausencia del inhibidor de xilanasa en la harina hace que el manejo de la masa sea muy difícil. Por lo tanto, lo que puede parecer una respuesta positiva en el volumen por la adición del inhibidor en la Tabla 6, probablemente pueda explicarse por la alta desviación estándar en la masa que carece de inhibidor, debido a las difíciles propiedades de manejo. Además, se puede concluir que todas las xilanasas probadas incrementan el volumen del pan significativamente comparado con el control en blanco.

20 Adherencia

La misma masa, que se utilizó para las pruebas de horneado, se utilizó para las medidas de adherencia. Los resultados se enumeran en la Tabla 7.

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

| ID            | TXU   | Inh., XIU/50 g | Promedio adherencia después de 10 min, g x s | Promedio adherencia después de 60 min, g x s |
|---------------|-------|----------------|--|--|
| Control       | 0     | 42             | 4,71   | 4,79   |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 42             | 12,20  | 13,39  |
| <i>A. nig</i> | 7.500 | 42             | 9,22   | 12,58  |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 850            | 2,51   | 3,66   |

| ID            | TXU   | Inh., XIU/50 g | Promedio adherencia después de 10 min, g x s | Promedio adherencia después de 60 min, g x s |
|---------------|-------|----------------|--|--|
| <i>A. sub</i> | 7.500 | 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 bajo nivel de inhibidor de xilanasas en combinación con xilanasas, fue muy difícil de manipular y moldear. Sin embargo, cuando se añadió el inhibidor, la masa se volvió seca y muy fácil de manejar. Como puede verse en la Tabla 7, la adición de xilanasas 990202 en combinación con el inhibidor disminuyó la adherencia. La masa se volvió más seca.

5

La Tabla 7 muestra también que solo hay un pequeño efecto de tiempo en la adherencia. Parece que las xilanasas actúan muy rápidamente. Dentro de los 10 primeros minutos la mayoría del arabinosilano se modifica cuando se añade la primera xilanasas (*B. sub*). La segunda xilanasas probada (*A. nig*), parece que actúa menos rápidamente. Una función del tiempo se puede observar fácilmente utilizando esta xilanasas. Ésta es también la xilanasas que muestra el menor efecto como una función del nivel de inhibidor cuando se analiza sobre la adherencia.

10

Viscosidad de la mezcla

Los resultados del análisis de la viscosidad de la masa y del pentosano se obtuvieron de la misma extracción a partir de la masa preparada a partir de la harina reconstituida añadida xilanasas e inhibidor de xilanasas. Esta masa se analizó después de dos tiempos de prueba, 30 y 120 minutos.

15 Los resultados del análisis de viscosidad se presentan en la Tabla 8.

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

| ID            | TXU   | Inh., XIU/50 g | Promedio de la viscosidad de la masa, cP, 30 minutos de prueba | Promedio de la viscosidad de la masa, cP, 60 minutos de prueba |
|---------------|-------|----------------|--|--|
| Control       | 0     | 42             | 5,21   | 5,56   |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 42             | 5,07   | 4,55   |
| <i>A. nig</i> | 7.500 | 42             | 5,78   | 4,14   |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 850            | 9,03   | 11,09  |
| <i>A. sub</i> | 7.500 | 850            | 8,44   | 8,55   |
| Control       | 0     | 850            | 5,96   | 6,95   |

Como puede verse en la Tabla 8 el inhibidor tiene un efecto significativo en la funcionalidad de las xilanasas. Sin la adición del inhibidor, el arabinosilano se despolimeriza a arabinosilano de Bajo Peso Molecular (LMW) con baja viscosidad. La adición del inhibidor evita esta despolimerización muy extensa del arabinosilano.

20

Análisis de pentosano del líquido de la masa

Los resultados del análisis de pentosano (arabinosilano) del líquido de la masa se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Datos que representan la solubilización del pentosano como una función del tiempo, adición de xilanasas e inhibidor de xilanasas a la harina reconstituida.

| ID            | TXU   | Inh., XIU/50 g | Promedio de Pentosano, %, 30 minutos de prueba | Promedio de Pentosano, %, 30 minutos de prueba |
|---------------|-------|----------------|--|--|
| Control       | 0     | 42             | 0,387  | 0,458  |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 42             | 0,766  | 0,819  |
| <i>A. nig</i> | 7.500 | 42             | 0,719  | 0,798  |
| <i>B. sub</i> | 7.500 | 850            | 0,410  | 0,544  |
| <i>A. sub</i> | 7.500 | 850            | 0,560  | 0,673  |
| Control       | 0     | 850            | 0,400  | 0,528  |

Como puede verse a partir de los resultados de la Tabla 9, la adición de un inhibidor de xilanasas endógeno disminuye la solubilización del arabinoxilano. Cuando se evaluó después de 30 minutos de tiempo de prueba, la cantidad de arabinoxilano solubilizado en ausencia del inhibidor es casi el doble de la cantidad que en presencia del inhibidor. Calculado sobre la base de las muestras de control relacionadas, la solubilización es mucho mayor en ausencia del inhibidor, como se ilustra en el siguiente ejemplo:

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

El ejemplo anterior se calculó en base a la solubilización de arabinoxilano utilizando la xilanasas de *Bacillus*, 30 minutos de prueba y +/- inhibidor.

Ejemplo 3 – Mutagénesis dirigida al sitio en xilanasas.

Los mutantes específicos de la xilanasas de *Bacillus subtilis* se pueden obtener por mutagénesis dirigida al sitio de la enzima de tipo nativo, mediante el uso de cualquiera de un número de kits de mutagénesis disponibles comercialmente. Un ejemplo de como obtener el mutante D11F utilizando el kit Quick Exchange, disponible en Stratagene Cloning Systems, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA se indica a continuación:

La secuencia de ADN que codifica la xilanasas A de *Bacillus subtilis* ha sido publicada por Paice y colaboradores, 1986.

La secuencia de la región codificante es la siguiente, con la secuencia que codifica la parte madura de la proteína mostrada en mayúsculas:

```

catatgtttaagtttaaaaagaatttcttagttggattatcggcagcctttaatgagtatt
agcttgttttcggcaaccgcctctgcaGCTAGCACAGACTACTGGCAAAATTGGACTGAT
GGGGCGGTATAGTAAACGCTGTCAATGGGTCTGGCGGAATTACAGTGTTAATTGGTCT
AATACCGGAAATTTTGTGTTGGTAAAGGTTGGACTACAGGTTCCGCATTTAGGACGATA
AACTATAATGCCGGAGTTTGGGCGCCGAATGGCAATGGATATTTAACTTTATATGGTTGG
ACGAGATCACCTCTCATAGAATATTATGTAGTGGATTTCATGGGGTACTTATAGACCTACT
GGAACGTATAAAGGTAAGTGTAAAAAGTGATGGGGGTACATATGACATATATACAACCTACA
CGTTATAACGCACCTTCCATTGATGGCGATCGCACTACTTTTACGCAGTACTGGAGTGT
CGCCAGTCGAAGAGACCAACCGGAAGCAACGCTACAATCACTTTCAGCAATCATGTFGAAC
GCATGGAAGAGCCATGGAATGAATCTGGGCAGTAATTGGGCTTACCAAGTCATGGCGACA
GAAGGATATCAAAGTAGTGGAAAGTTCTAACGTAACAGTGTGGTAA
    
```

La parte del gen que codifica la parte madura de la enzima de tipo nativo se puede expresar intracelularmente en *E. coli* por métodos bien conocidos por las personas expertas en la técnica de biología molecular. Por ejemplo:

1. Generar una copia de la parte en mayúsculas del gen descrito anteriormente mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un sitio de la enzima de restricción Nde1 (CATATG) añadido antes del GCTAGCACA y un sitio de restricción HindIII (AAGCTT) añadido después del GTGTGGTAA.

2. Insertar la copia modificada resultante del gen mediante el uso de las enzimas mencionadas anteriormente en el vector de expresión pET24a(+), que se puede obtener de Novagen, Inc. 601 Science Drive, Madison, WI 53711, USA.

3. Transformar en una cepa de *E. coli* adecuada y expresar por fermentación según lo descrito por el proveedor de pET24a(+).

Nuestra enzima mutante D11F se puede obtener mediante la utilización del kit de mutagénesis "Quick Exchange" de acuerdo con el fabricante, y utilizando el constructo pET24a(+) de xilanasas de tipo nativo de *Bacillus subtilis* y los siguientes cebadores de mutagénesis por PCR:

Cebador con sentido:

CTACTGGCAAAATTGGACTTTTGGAGGAGGTATAGTAAACGCTG

Cebador antisentido:

CAGCGTTTACTATACCTCCTCCAAAAGTCCAATTTTGCCAGTAG

La enzima mutante se expresa y purifica utilizando los mismos procedimientos como para la enzima de tipo nativo.

Ejemplo 4 – Estudios de inhibición de los mutantes de xilanasa

Los mutantes de xilanasa expresados en *E. coli* (véase Ejemplo 3) se fermentaron y purificaron (lo que significa que no estaba presente ninguna otra actividad xilanolítica en la preparación purificada) utilizando una etapa de desalinización y una etapa de cromatografía de intercambio catiónico.

- 5 Estas preparaciones de mutante de xilanasa pura se diluyeron a 12 TXU/ml utilizando ácido cítrico 0,1 M – hidrogeno fosfato di sódico 0,2 M, pH 5,0 y se utilizaron en el siguiente ensayo.

Se preparó una preparación de inhibidor estable de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Esta preparación de inhibidor estable se utiliza como reserva para todos los estudios del inhibidor de xilanasa-xilanasa. Utilizando el método de cuantificación del inhibidor descrito en el Ejemplo 1, la preparación de inhibidor se analizó que contenía 126 XIU/ml.

Ensayo

A 250 µl de las preparaciones de mutante de xilanasa diluidas, se añaden 0, 10, 25, 50 o 100 µl de preparación de inhibidor, respectivamente. A estas mezclas xilanasa-inhibidor se añadieron ácido cítrico 0,1 M – hidrogeno fosfato di sódico 0,2 M, pH 5,0 obteniéndose el volumen final de 1.000 µl. Estas mezclas de reacción se preincubaron durante 5 minutos a 40°C. En lo sucesivo, se añadió 1 tableta de xylazyme (Megazyme, Ireland) a todas las mezclas xilanasa-inhibidor. Después de 10 minutos de incubación a 40°C, se terminaron las reacciones, por adición de 10 ml de Tris/NaOH al 2%, pH 12,0. Las mezclas se centrifugaron y el color azul liberado del sustrato se midió a 590 nm.

Los resultados se presentan en la Tabla 10.

20 Tabla 10. Inhibición relativa de mutantes de xilanasa y xilanasa parental (aquí enzima de tipo nativo) como una función de xilanasa.

| Mutante ID  | 0   | 1,26 | 3,15                          | 6,3 | 12,6 |
|-------------|-----|------|-------------------------------|-----|------|
|             |     |      | <b>Inhibición relativa, %</b> |     |      |
| Tipo nativo | 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   |

ES 2 656 440 T3

| Mutante ID | 0   | 1,26 | 3,15                   | 6,3 | 12,6 |
|------------|-----|------|------------------------|-----|------|
|            |     |      | Inhibición relativa, % |     |      |
| 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 | 104  | 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  |

A partir de los resultados en la tabla 10, se puede observar que los mutantes de xilanasa D11Y, D11F, D11K, D11F/R122D y D11F/G34D no están inhibidos por el inhibidor de xilanasa endógeno de trigo. Se esperaría que estos mutantes de xilanasa actuaran más agresivamente/específicamente sobre el arabinoxilano soluble, en comparación con los otros mutantes de xilanasa u otras xilanasas. Por lo tanto, serían superiores en aplicaciones donde se desea una disminución en la viscosidad (como una función de arabinoxilano HMW).

Ejemplo 5 – Estudios de funcionalidad de mutantes de xilanasa

Los mutantes de xilanasa expresados en *E. coli* (véase Ejemplo 3) se fermentaron y purificaron (lo que significa que no estaban presentes otras actividades xilanolíticas en la preparación purificada).

5 Estas preparaciones de mutantes de xilanasas puras se diluyeron a 400 TXU/ml utilizando agua y se utilizaron en el siguiente ensayo.

Ensayo

10 200 ml de suspensión de harina al 30% (peso/peso) se prepararon utilizando agua (termostatizada a 25°C), por agitación durante 5 minutos. Se vierten 60,0 ml de esta suspensión de harina en una copa Ford, y se mide el tiempo para el drenaje de 50,0 ml. Esta medición es la medición en blanco. Los 60,0 ml de suspensión de harina y 1000 µl de preparación de mutante de xilanasa diluido se añaden a la suspensión de harina bajo agitación. Después de 2, 5, 10 y 20 minutos, se vierten 60,0 ml en la copa Ford, y se registra el tiempo para drenaje de 50,0 ml. Esta medición se hizo por triplicado.

Los resultados se presentan en la Tabla 11.

15 Tabla 11. Viscosidad relativa de la suspensión de harina como una función del mutante de xilanasa y xilanasa parental (aquí xilanasa de tipo nativo)

| Mutante ID  | Tiempo de incubación, minutos |     |                                  |     |     |
|-------------|-------------------------------|-----|----------------------------------|-----|-----|
|             | 0                             | 2   | 5                                | 10  | 20  |
|             |                               |     | Cambio de viscosidad relativa, % |     |     |
| Tipo nativo | 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 |
| N114A       | 100                           | 117 | 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 |



ES 2 656 440 T3

| Mutante ID | Tiempo de incubación, minutos    |     |     |     |     |
|------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
|            | 0                                | 2   | 5   | 10  | 20  |
|            | Cambio de viscosidad relativa, % |     |     |     |     |
| 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. La mutación dirigida al sitio en el sitio activo de la xilanasa A de *Bacillus subtilis*, no influye en la interacción xilanasa:inhibidor de xilanasa.

Un resto en el sitio activo de la enzima de xilanasa A de tipo nativo de *Bacillus subtilis* se alteró mediante una mutación dirigida al sitio (véase Ejemplo 3). En el resto mutado (Y166F) se pierde un enlace de hidrógeno potencial.

La xilanasas mutante, se expresó en *E. coli*, fermentó y purificó. En lo sucesivo, el mutante se investigó por su interacción con el inhibidor de xilanasas (véase Ejemplo 4).

5 Como puede observarse a continuación (Tabla 12), el intercambio de un aminoácido en el sitio activo, no tuvo, sorprendentemente, ningún efecto en las interacciones con el inhibidor de xilanasas en comparación con la enzima de xilanasas de tipo nativo de *Bacillus subtilis*.

Tabla 12. Inhibición relativa de xilanasas de tipo nativo de *Bacillus subtilis* y el mutante de xilanasas Y166F.

|                     |          |             | XIU/ml                 |            |             |
|---------------------|----------|-------------|------------------------|------------|-------------|
| <b>Xilanasas ID</b> | <b>0</b> | <b>1,26</b> | <b>3,15</b>            | <b>6,3</b> | <b>12,6</b> |
|                     |          |             | Inhibición relativa, % |            |             |
| Tipo nativo         | 100      | 75          | 40                     | 24         | 20          |
| Y166F               | 100      | 74          | 39                     | 22         | 20          |

Por lo tanto, en resumen el experimento descrito anteriormente muestra una mutación dirigida al sitio en el sitio activo de la xilanasas A de *Bacillus subtilis*, cuya mutación no influye en las interacciones de las xilanasas con el inhibidor de xilanasas.

10 Ejemplo 7. Mutación dirigida al sitio en las xilanasas de la familia 11 distintas de la xilanasas A de *Bacillus subtilis*, que influyen en las interacciones xilanasas – inhibidor de xilanasas.

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

15 Los cebadores para la construcción por PCR del mutante D19F pueden ser los siguientes:

Cebador con sentido:

GGTTACTACTATTCTGGTGGAGTTTTGGAGGAGCGCAGGCCACG

Cebador antisentido:

CGTGGCCTGCGCTCCTCCAAAACCTCCACCAGGAATAGTAATAACC

20 La xilanasas mutante obtenida (D19F), se expresó en *E. coli*, fermentó y purificó. En lo sucesivo, el mutante y la xilanasas A de tipo nativo de *Thermomyces lanuginosus* se investigaron para determinar su interacción con el inhibidor de xilanasas (véase ejemplo 4). Como puede observarse de los resultados de la Tabla 13, el mutante D19F de la xilanasas A de *Thermomyces lanuginosus* está significativamente menos inhibido por el inhibidor de xilanasas en comparación con la xilanasas de tipo nativo de *Thermomyces lanuginosus*.

25 Tabla 13. Inhibición relativa de la xilanasas A de tipo nativo de *Thermomyces lanuginosus* y la xilanasas mutante D19F de *Thermomyces lanuginosus*, (D19F).

|                     |          |             | XIU/ml                 |            |             |
|---------------------|----------|-------------|------------------------|------------|-------------|
| <b>Xilanasas ID</b> | <b>0</b> | <b>1,26</b> | <b>3,15</b>            | <b>6,3</b> | <b>12,6</b> |
|                     |          |             | Inhibición relativa, % |            |             |
| TLX                 | 100      | 45          | 24                     | 17         | 14          |
| D19F                | 100      | 73          | 38                     | 24         | 20          |

30 Por lo tanto, en resumen el experimento descrito anteriormente muestra una mutación dirigida al sitio en la xilanasas A de *Thermomyces lanuginosus*. Los resultados muestran que una mutación que introduce una sustitución de un aminoácido en la superficie de la molécula de xilanasas (análogo al D11F en *B. subtilis*) cambia las interacciones de xilanasas:inhibidor de xilanasas. Por lo tanto, nuestra invención (es decir que los restos de la superficie controlan el nivel de inhibición de xilanasas) es válida para las xilanasas que son homólogas a la xilanasas de *B. subtilis*.

Aspectos adicionales se describen en los siguientes párrafos numerados.

35 1. Una variante del polipéptido de xilanasas, o fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, que comprende una o más modificaciones de aminoácidos tales que el polipéptido o fragmento del mismo presenta una sensibilidad alterada a un inhibidor de xilanasas en comparación con la enzima xilanasas parental.

2. Una variante del polipéptido de acuerdo con el párrafo 1 que se deriva de una xilanasas de la familia 11.
3. Una variante del polipéptido de xilanasas, o fragmento del mismo que tiene una actividad de xilanasas, de acuerdo con el párrafo 1 o párrafo 2 en donde dicha modificación de aminoácido es de uno o más restos de aminoácidos de superficie.
- 5 4. Una variante del polipéptido de xilanasas, o un fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde dicha modificación de aminoácido es de uno o más restos accesibles al disolvente.
5. Una variante del polipéptido de xilanasas, o un fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde hay al menos dos de dichas modificaciones de aminoácidos.
- 10 6. Una variante del polipéptido de xilanasas, o un fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde dicha modificación de aminoácidos está en uno cualquiera o más restos 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
- 15 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o su/sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasas homólogos.
7. Una variante del polipéptido de xilanasas, o fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde dicha modificación de aminoácido está en uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos números: 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 175 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasas homólogos.
- 20 8. Una variante del polipéptido de xilanasas, o un fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, de acuerdo con el párrafo 7 en donde dicha variante del polipéptido de xilanasas, o fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, comprende además una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera de los otros restos de aminoácidos.
- 25 9. Una variante del polipéptido de xilanasas, o un fragmento del mismo que tiene actividad de xilanasas, de acuerdo con el párrafo 8 en donde dichos restos de otros aminoácidos son uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos números: 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 de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasas homólogos.
- 30 10. Una variante del polipéptido de xilanasas, o un fragmento de mismo que tiene actividad de xilanasas, de acuerdo con el párrafo 8 en donde dichos otros restos de aminoácidos de superficie son uno cualquiera o más de los restos de aminoácidos números: 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 de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o sus posiciones equivalentes en otros polipéptidos de xilanasas homólogos.
11. Una variante del polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde el inhibidor es un inhibidor que se encuentra naturalmente en tejidos vegetales.
- 40 12. Una variante del polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos anteriores en donde la sensibilidad al inhibidor es reducida.
13. Un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasas a un inhibidor cuyo método comprende modificar uno o más restos de aminoácidos de dicha enzima de tal manera que el polipéptido o un fragmento del mismo tenga una sensibilidad alterada a un inhibidor de xilanasas en comparación con la enzima de xilanasas parental.
- 45 14. Un método de acuerdo con el párrafo 13 en donde dicha variante del polipéptido es la que está definida en uno cualquiera de los párrafos 1 a 12.
15. Un método de acuerdo con el párrafo 13 o el párrafo 14 en donde la sensibilidad es reducida.

16. Una composición que comprende una variante del polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 12.

5 17. Un método para degradar o modificar una pared celular vegetal cuyo método comprende poner en contacto dicha pared celular vegetal con un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 o una composición de acuerdo con el párrafo 16.

18. Un método para procesar un material vegetal cuyo método comprende poner en contacto dicho material vegetal con un polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 o una composición de acuerdo con el párrafo 16.

10 19. Una secuencia de nucleótidos que codifica una variante del polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 12.

20. Un constructo que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con el párrafo 19.

21. El uso de una variante del polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 en un método para modificar los materiales vegetales.

15 22. El uso de una variante del polipéptido de acuerdo con uno cualquiera de los párrafos 1 a 12 en uno cualquiera o más de: horneado, procesamiento de cereales, producción de almidón, en procesamiento de madera, mejora del blanqueo de la pasta de madera.

### **Compendio**

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

20

**Referencias**

Courtin, C., Roelants, A. and Delcour, J.. (1999). Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47. 1870-1877.

D'Appalonia, B.L. and MacArthur, L.A. (1976). Comparison of bran and endosperm pentosans in immature and mature wheat. *Cereal Chem.* 53. 711 - 718.

Debyser, W. and Delcour, J. A. (1998). Inhibitors of cellolytic, xylanolytic and  $\beta$ -glucanolytic enzymes. WO 98/49278.

Hazlewood, G. P. and Gelbert, H. J. (1993). Recombinant xylanases. PCT application. WO 93/25693.

Ingelbrecht, J. A., Verwimp, T, and Delcour, J. A. (1999). Endoxylanases in durum wheat semolina processing: solubilisation of arabinoxylans, action of endogenous inhibitors and effects on rheological properties. *J. Agri. Food Chem.*

Jacobsen, T. S., Heldt-Hansen, H. P., Kofod, L. V., Bagger, C. and Müllertz, A. (1995). Processing plant material with xylanase. PCT application. WO 95/23514.

Kormelink, F. J. M. (1992). Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Holland (175 pp., English and Dutch summaries).

McLauchlan, R., Garcia-Conesa, M. T., Williamson, G., Roza, M., Ravestein, P. and MacGregor, A. W.. (1999a). A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochem.J.* 338. 441-446.

McLauchlan, R, Flatman, R et al (1999) Poster Presentation from meeting at University of Newcastle (1999) April 11th-April 17th. Xylanase inhibitors, a novel class of proteins from cereals.

Montgomery, R. and Smith, F. (1955). The Carbohydrates of the Gramineae. VIII. The constitution of a water soluble hemicellulose of the endosperm of wheat (*Triticum vulgare*). *J. Am. Chem. Soc.* 77. 3325 - 3328.

Paice, M.G., Bourbonnais, R., Desrochers, M., Jurasek, L. and Yaguchi, M. (1986) : A Xylanase Gene from *Bacillus subtilis*: Nucleotide Sequence and Comparison with *B. pumilus* Gene. *Arch. Microbiol.* 144, 201-206.)

Rouau, X. (1993). Investigations into the effects of an enzyme preparation fro baking on wheat flour dough pentosans. *J. Cereal Science.* 18. 145-157.

Rouau, X., El-Hayek, M-L. and Moreau, D. (1994). Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flour in relation to changes in pentosan properties. *J. Cereal Science.* 19. 259-272.

Slade, L., Levine, H., Craig, S., Arciszewski, H. and Saunders, S. (1993). Enzyme treated low moisture content comestible products. US 5200215 by Nabisco.

Soerensen, J.F. and Sibbesen,O. (1999). Bacterial xylanase. UK A 9828599.2.

# ES 2 656 440 T3

## Secuencias

La secuencia de aminoácidos de la xilanasasa de *Bacillus subtilis* madura (SEQ.ID NO. 1).

```
1      10 11      20 21      30 31      40 41      50 51      60
ASTDYWQNWT DGGGIVNAVN GSGGNYSVNW SNTGNFVVGK GWTTGSPFRT INYNAGVWAP

61      70 71      80 81      90 91      100 101      110 111      120
NGNGYLTLYG WTRSPLEIYY VVDSWGTYRP TGTYKGTVKS DGGTYDIYTT TRYNAPSIDG

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

181
NVTVW
```

Secuencias de aminoácidos derivadas del inhibidor de xilanasasa de harina de trigo

### 5 Cadena A del inhibidor

N-terminal:

GAPVARAVEAVAPFGVCYDTKTLGNNLGGYAVPNV (35aa) SEQ ID NO. 2

C-terminal:

KRLGFSRLPHFTGCGGL (17aa) SEQ ID NO. 3

### 10 Cadena B del inhibidor

N-terminal

LPVPAPVTKDPATSLYTIPFH (21aa) SEQ ID NO. 4

Cadena B digerida con Lys-C:

LLASLPRGSTGVAGLANGLALPAQVASAQK (31aa) SEQ ID NO. 5

GGSPAHYZSARFIEVGDTRVPSVE (24aa) SEQ ID NO. 6

VNVGVLAACAPSK (13aa) SEQ ID NO. 7

VANRFLCLPTGGPGVAIFGGGPVWPQFTQSMPYTLVVVK SEQ ID NO. 8

15

# ES 2 656 440 T3

Gen de xilanasa A de *Thermomyces lanuginosus* (SEQ ID NO. 9)

```

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

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

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

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

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

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

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

```

**Listado de secuencias**

- <110> Danisco A/S
  - <120> Variantes de xilanasa que tienen la sensibilidad alterada a inhibidores de xilanasa
  - <130> P008526EPA
  - 5 <150> GB 0005585.5
  - <151> 08-03-2000
  - <150> GB 0015751.1
  - <151> 27-06-2000
  - <160> 66
  - 10 <170> PatentIn version 3.0
  - <210> 1
  - <211> 185
  - <212> PRT
  - <213> Bacillus subtilis
  - 15 <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
- Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp  
180 185
- <210> 2
  - <211> 35
  - <212> PRT
  - 20 <213> Triticum aestivum



ES 2 656 440 T3

<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

5 <210> 3  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

<400> 3  
 Lys Arg Leu Gly Phe Ser Arg Leu Pro His Phe Thr Gly Cys Gly Gly  
 1 5 10 15

Leu

10 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

<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

15 <210> 5  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

<400> 5  
 Leu Leu Ala Ser Leu Pro Arg Gly Ser Thr Gly Val Ala Gly Leu Ala  
 1 5 10 15

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

<210> 6  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

25 <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

30 <210> 7  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Triticum aestivum

ES 2 656 440 T3

<400> 7

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

<210> 8

<211> 41

5 <212> PRT

<213> Triticum aestivum

<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

10 <211> 588

<212> ADN

<213> Thermomyces lanuginosus

<400> 9

atgcagacaa ccccccaactc ggagggctgg cacgatgggtt attactattc ctgggtggagt        60  
 gacgggtggag cgcaggccac gtacaccaac ctggaaggcg gcacctacga gatcagctgg        120  
 ggagatggcg gtaacctcgt cgggtggaaag ggctggaacc ccggcctgaa cgcaagagcc        180  
 atccactttg aggggtgttta ccagccaaac ggcaacagct accttgccggg ctacggttgg        240  
 acccgcaacc cgctgggtcga gtattacatc gtgcagaact ttggcaccta tgatccttcc        300  
 tccggtgcta ccgatctagg aactgtcagag tgcgacggta gcatctatcg actcggcaag        360  
 accactcgcg tcaacgcacc tagcatcgac ggcacccaaa ccttcgacca atactggtcg        420  
 gtccgcagcagg acaagcgcac cagcgggtacc gtccagacgg gctgccactt cgacgcctgg        480  
 gctcgcgctg gtttgaatgt caacgggtgac cactactacc agatcgtttgc aacggagggc        540  
 tacttcagca gcggctatgc tcgcatcacc gttgctgacg tgggctaa                    588

<210> 10

15 <211> 645

<212> ADN

<213> Bacillus subtilis

ES 2 656 440 T3

<400> 10  
 catatgttta agtttaaaaa gaatttctta gttggattat cggcagcttt aatgagtatt 60  
 agcttgtttt cggcaaccgc ctctgcagct agcacagact actggcaaaa ttggactgat 120  
 gggggcggta tagtaaaccg tgtcaatggg tctggcggga attacagtgt taattggtct 180  
 aataccggaa attttgttgt tggtaaaggt tggactacag gttcgcatt taggacgata 240  
 aactataatg ccggagtttg ggcgccgaat ggcaatggat atttaacttt atatggttgg 300  
 acgagatcac ctctcataga atattatgta gtggattcat ggggtactta tagacctact 360  
 ggaacgtata aaggtagctgt aaaaagtgat gggggtacat atgacatata tacaactaca 420  
 cgttataacg caccttccat tgatggcgat cgcactactt ttacgcagta ctggagtgtt 480  
 cgccagtcga agagaccaac cgaagcaac gctacaatca ctttcagcaa tcatgtgaac 540  
 gcatggaaga gccatggaat gaatctgggc agtaattggg cttaccaagt catggcgaca 600  
 gaaggatatt aaagtagtgg aagttctaac gtaacagtgt ggtaa 645

<210> 11  
 <211> 657  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de la xilanas A de *Bacillus subtilis* con sitio de restricción añadido

<400> 11  
 catatgttta agtttaaaaa gaatttctta gttggattat cggcagcttt aatgagtatt 60  
 agcttgtttt cggcaaccgc ctctgcacat atggctagca cagactactg gcaaaattgg 120  
 actgatgggg gcggtatagt aaacgctgtc aatgggtctg gcgggaatta cagtgttaat 180  
 tgggtctaata ccggaaattt tgttgttggg aaaggttgga ctacaggttc gccatttagg 240  
 acgataaact ataatgccgg agtttgggcg ccgaatggca atggatattt aactttatat 300  
 ggttggacga gatcacctct catagaatat tatgtagtgg attcattggg tacttataga 360  
 cctactggaa cgtataaagg tactgtaaaa agtgatgggg gtacatatga catatataca 420  
 actacagtt ataacgcacc ttccattgat ggcgatcgca ctacttttac gcagtactgg 480  
 agtgttcgcc agtcgaagag accaaccgga agcaacgcta caatcacttt cagcaatcat 540  
 gtgaacgcat ggaagagcca tggatgaat ctgggcagta attgggctta ccaagtcatg 600  
 gcgacagaag gatattcaaag tagtggaggt tctaacgtaa cagtgtggta aaagctt 657

<210> 12  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cebador sentido

ES 2 656 440 T3

```

<400> 12
ctactggcaa aattggactt ttggaggagg tatagtaaac gctg          44

<210> 13
<211> 44
5 <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador antisentido

<400> 13
10 cagcgtttac tatactctct ccaaaagtcc aatttgcca gtag          44

   <210> 14
   <211> 45
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

15 <220>
   <223> Cebador sentido

   <400> 14
   ggttattact attcctggtg gagttttgga ggagcgcagg ccacg          45

20 <210> 15
   <211> 45
   <212> ADN
   <213> Secuencia artificial

   <220>
   <223> Cebador antisentido

25 <400> 15
   cgtggcctgc gctcctccaa aactccacca ggaatagtaa taacc          45

   <210> 16
   <211> 213
30 <212> PRT
   <213> Bacillus subtilis

<400> 16
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

```

ES 2 656 440 T3

Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe Arg Thr Ile Asn  
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  
145 150 155 160  
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
- 5 <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  
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

ES 2 656 440 T3

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

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

5 <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  
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

ES 2 656 440 T3

<210> 19  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> *Aeromonas caviae*

5 <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  
 195 200 205  
 Thr Val Trp  
 210

<210> 20  
 <211> 221  
 <212> PRT  
 <213> *Cochliobolus carbonum*

10 <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

ES 2 656 440 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     | 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

5 <213> Helminthosporium turcicum

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| 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  |     |  |  |  |  |



ES 2 656 440 T3

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

5 <213> Ascochyta 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

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



ES 2 656 440 T3

<211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Thermomyces 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  
 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

5 Gly  
 225

<210> 25  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Cochliobolus carbonum

10 <400> 25

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

ES 2 656 440 T3

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  
 Asp Ile Tyr Val Gln Thr Gln  
 225 230

<210> 26  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Cochliobolus sativus

5

<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

ES 2 656 440 T3

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> Humicola insolens

5

<400> 27  
 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

ES 2 656 440 T3

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

5 <213> Magnaporthe 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

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

ES 2 656 440 T3

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

5 <213> Chaetomium 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

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

10 <213> Trichoderma reesei

<400> 30

ES 2 656 440 T3

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  
 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
- 5 <213> *Trichoderma 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



ES 2 656 440 T3

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

<210> 32  
<211> 222  
<212> PRT  
5 <213> *Trichoderma 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

ES 2 656 440 T3

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  
 5 <213> Trichoderma harzianum

<400> 33

Gln Thr Ile Gly Pro Gly Thr Gly Tyr Ser Asn Gly 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  
 10 <212> PRT  
 <213> Trichoderma viride

ES 2 656 440 T3

<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  
 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> Chaetomium gracile

5

<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

ES 2 656 440 T3

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  
 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

5 <213> *Aspergillus 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

ES 2 656 440 T3

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 Ser Ile Thr Val  
 210 215 220

Gln  
 225

- <210> 37
- <211> 221
- <212> PRT
- 5 <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



ES 2 656 440 T3

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  
 5 <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

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  
 10 <212> PRT  
 <213> Streptomyces thermocyaneoviolaceus

<400> 40

ES 2 656 440 T3

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

5 <213> *Streptomyces 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



ES 2 656 440 T3

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  
5 <213> *Tilletia 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

ES 2 656 440 T3

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

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

5 <213> Cellulomonas 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

ES 2 656 440 T3

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  
 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

5 <213> *Aspergillus 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

ES 2 656 440 T3

<211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Clavaria purpurea

<400> 45

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  
 5 210 215

<210> 46  
 <211> 236  
 <212> PRT  
 <213> Cellvibrio mixtus

10 <400> 46

Met Lys Phe Pro Leu Ile Gly Lys Ser Thr Leu Ala Ala Leu Phe Cys  
 1 5 10 15

ES 2 656 440 T3

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  
 5 <213> Pseudomonas 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

ES 2 656 440 T3

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  
 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> Peronospora cochleariae

5

<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

ES 2 656 440 T3

|    |       |                      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|----|-------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
|    | 130   |                      |     |     |     | 135 |     |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |  |
|    | Arg   | Thr                  | Asn | Ala | Pro | Ser | Ile | Ile | Gly | Thr | Gln | Ser | Phe | Asp | Gln | Tyr |  |
|    | 145   |                      |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |  |
|    | 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                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 5  | <213> | Aspergillus kawachii |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|    | <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                  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 10 | <213> | Aspergillus niger    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |

ES 2 656 440 T3

<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

5 <212> PRT

<213> Aspergillus tubigenensis

<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



ES 2 656 440 T3

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 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

5 <213> *Penicillium 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  
 115 120 125

ES 2 656 440 T3

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  
 145 150 155 160

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

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

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

<210> 53

<211> 209

<212> PRT

5 <213> Cryptococcus sp. S-2

<400> 53

Met Val Ala Ser Ala Ala Pro Val Thr Glu Ala Glu Asp Gly Gln Ala  
 1 5 10 15

Ala Thr Pro Ile Ala Ile Glu Lys Arg Thr Gly Asn Tyr Val Gln Asn  
 20 25 30

Tyr Asn Gly Asn Val Ala Asn Phe Glu Tyr Ser Gln Tyr Asp Gly Thr  
 35 40 45

Phe Ser Val Asn Trp Asn Gly Asn Thr Asp Phe Val Cys Gly Leu Gly  
 50 55 60

Trp Thr Val Gly Thr Gly Arg Thr Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Tyr Asn  
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Ser Gly Ser Tyr Gln Ala Ile Tyr Gly Trp Thr Gly Gln  
 85 90 95

Gly Ser Leu Ser Glu Tyr Tyr Val Ile Asp Asn Tyr Gly Gly Tyr Asn  
 100 105 110

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

Gly Ser Ser Tyr Gln Val Cys Thr His Thr Gln Tyr Asn Gln Pro Ser  
 130 135 140

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

ES 2 656 440 T3

Lys Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Met Gln Asn His Phe Asn Tyr Trp  
 165 170 175

Ala Gln His Gly Phe Pro Asn Arg Asn Phe Asn Tyr Gln Val Leu Ala  
 180 185 190

Val Glu Gly Phe Ser Gly Ser Gly Asn Ala Asn Met Lys Leu Ile Ser  
 195 200 205

Gly

<210> 54

<211> 229

<212> PRT

5 <213> Trichoderma 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

ES 2 656 440 T3

Gln Ser Val Ser Asn  
225

<210> 55  
<211> 227  
<212> PRT  
<213> Bacillus pumilus

5

<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> Bacillus pumilus

10

<400> 56

ES 2 656 440 T3

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

5 <213> Clostridium 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



ES 2 656 440 T3

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  
5 <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

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

ES 2 656 440 T3

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

5 <213> *Phytophthora multivesiculata*

<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







ES 2 656 440 T3

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

5 <213> Dictyoglomus 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

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

ES 2 656 440 T3

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

5 <213> Ruminococcus 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

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

ES 2 656 440 T3

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  
5 <213> *Pichia 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

ES 2 656 440 T3

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

## REIVINDICACIONES

1. Un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasa de la Familia 11 a un inhibidor, cuyo método comprende:
- (a) modificar uno o más restos de aminoácidos de dicho polipéptido;
- 5 en donde dichas modificaciones están en una cualquiera de las posiciones 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 o 175 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1, o en la posición(es) equivalente(s) en otras xilanasas homólogas, en donde al menos una de dichas modificaciones de aminoácido está al menos en la posición 11 de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1 o en posición(es) equivalente(s) en otras xilanasas homólogas;
- 10 (b) medir la sensibilidad de dicho polipéptido de xilanasa a un inhibidor de xilanasa; y
- (c) medir el efecto de dicho polipéptido de xilanasa en la viscosidad de la suspensión de harina;
- en donde dicho polipéptido o fragmento del mismo tiene una sensibilidad reducida a un inhibidor de xilanasa en comparación con la enzima xilanasa parental; en donde además dicho polipéptido o fragmento del mismo disminuye la viscosidad de la suspensión de harina más que la enzima xilanasa parental.
- 15 2. Un método para alterar la sensibilidad de un polipéptido de xilanasa de la Familia 11 a un inhibidor cuyo método comprende:
- (a) modificar dos o más restos de aminoácidos de dicho polipéptido;
- en donde dichas modificaciones están en dos o más de las posiciones 11, 12, 13, 15, 17, 29, 31, 32, 34, 113, 114, 119, 120, 121, 122, 123, 124 y 175 de una secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ. ID. NO. 1, o en una posición(es) equivalente(s) en otras xilanasas homólogas;
- 20 en donde una de dichas modificaciones de aminoácidos está en la posición 11;
- (b) medir la sensibilidad de dicho polipéptido de xilanasa a un inhibidor de xilanasa; y
- (c) medir el efecto de dicho polipéptido de xilanasa en la viscosidad de la suspensión de harina;
- en donde dicho polipéptido o fragmento del mismo tiene una sensibilidad reducida a un inhibidor de xilanasa en comparación con la enzima xilanasa parental; en donde además dicho polipéptido o fragmento del mismo disminuye la viscosidad de la suspensión de harina más que la enzima xilanasa parental.
- 25 3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dicha modificación de aminoácido se lleva a cabo por mutagénesis del sitio.
4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde una de dichas modificaciones de aminoácidos es una cualquiera de: D11Y, D11N, D11F, D11K, D11S, D11W, G12F, G13F, I15K, N17K, N17Y, N17D, N29K, N29Y, N29D, S31K, S31Y, S31D, N32K, G34D, G34F, G34T, Y113A, Y113D, Y113K, N114A, N114D, N114F, N114K, D119K, D119Y, D119N, G120K, G120D, G120F, G120Y, G120N, D121N, D121K, D121F, D121A, R122D, R122F, R122A, T123K, T123Y, T123D, T124K, T124Y, T124D, Q175E, Q175S y Q175L.
- 30 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde una de dichas modificaciones de aminoácidos es una cualquiera de: D11Y, D11N, D11F, D11K, D11S o D11W.
6. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde una de dichas modificaciones de aminoácidos es D11F.
7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde dos de dichas modificaciones de aminoácidos son D11F y R122D.
- 40 8. El uso de una variante del polipéptido de xilanasa proporcionada por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en un método para modificar los materiales vegetales.
9. El uso de una variante del polipéptido de xilanasa proporcionada por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en uno o más de: panadería, alimentación animal, producción de almidón, separación de harina (molienda húmeda) y, producción de papel y pasta.
- 45 10. El uso de una variante del polipéptido de xilanasa proporcionada por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en uno o más de: procesamiento de cereales, producción de almidón, alimentación animal, en procesamiento de madera, mejora del proceso de blanqueamiento de la pasta de madera.

11. El uso de una variante del polipéptido de xilanasa proporcionada por el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para alterar la viscosidad derivada de la presencia de hemicelulosa o arabinoxilano en una solución o sistema que comprende un material de pared celular vegetal.



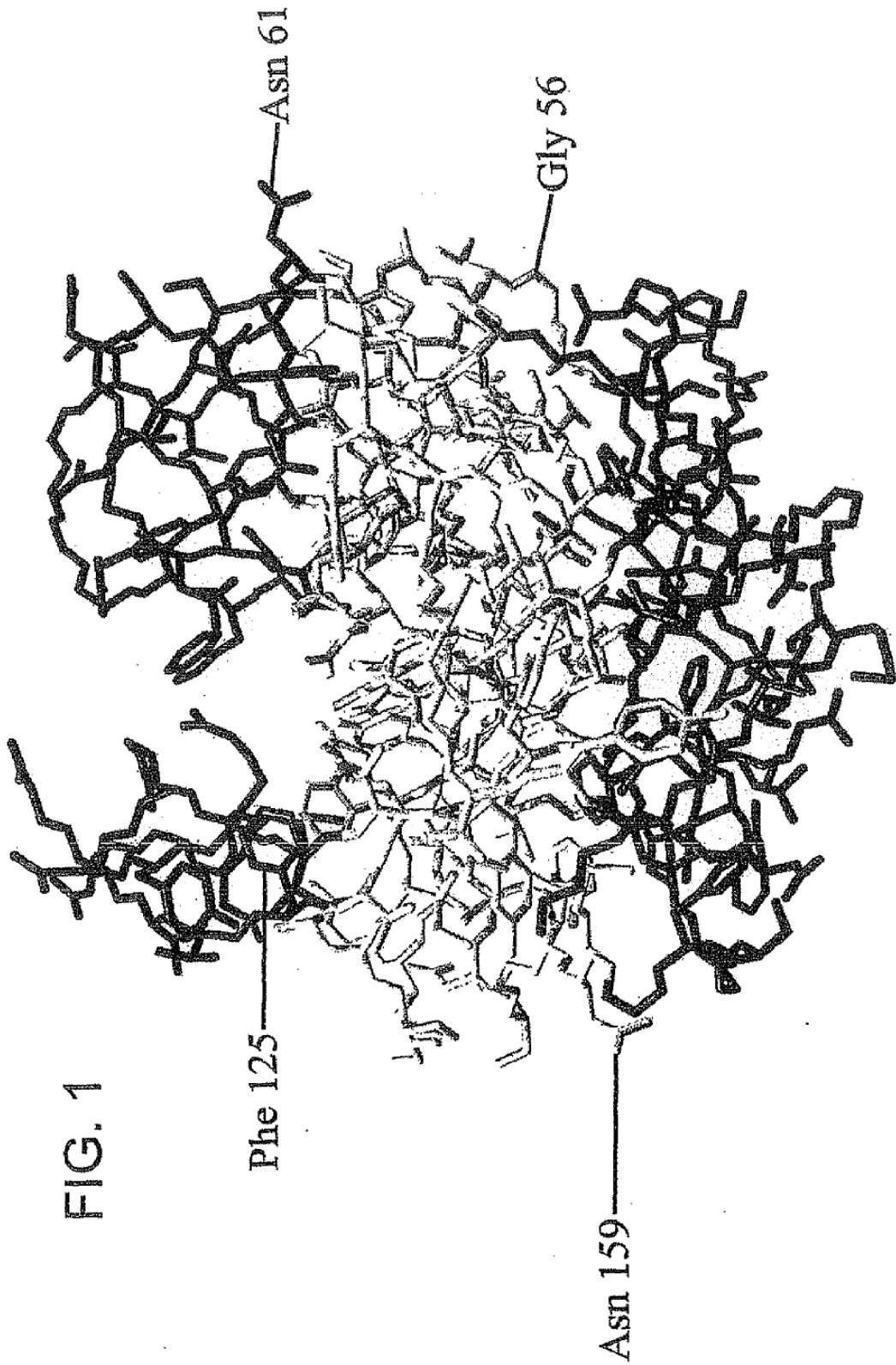


FIG. 1

FIG. 2

|                               | 1   | 15 16      | 30 31           | 45 46     | 60 61 | 75 76 | 90                    |
|-------------------------------|-----|------------|-----------------|-----------|-------|-------|-----------------------|
| B. subtilis xyla              | --- | MEFRKNELVG | LSAALMSISLFSATA | S---      | ---   | ---   | AASTDI                |
| B. circulans xyla             | --- | MEFRKNELVG | LSAALMSISLFSATA | S---      | ---   | ---   | AASTDI                |
| B. stearothermophilus xyla    | --- | MUKKMLTL   | LLTASMSGLFCATS  | ---       | ---   | ---   | SAATDY                |
| A. caryae xyla                | --- | MVFSIITAA  | VAAATGALAAPADVS | ---       | ---   | ---   | IVA RONTNGBEETHNGCF   |
| C. carbonum xyl1              | --- | MVFSIITAA  | VAAATGALAAPADVS | ---       | ---   | ---   | IVA RONTNGBEETHNGCF   |
| H. turcicum xyl1              | --- | MVFSIITAA  | VAAATGALAAPADVS | ---       | ---   | ---   | IVA RONTNGBEETHNGCF   |
| A. pisi xyl                   | --- | MVFSIITAA  | VAAATGALAAPADVS | ---       | ---   | ---   | IVA RONTNGBEETHNGCF   |
| S. commune xyla               | --- | MVGFVPLAA  | LAATGALAPAGNAT  | ---       | ---   | ---   | ELEK ROTTNBECEWHHDGYY |
| T. lanuginosus xyla           | --- | MVSEKSLIAA | VATSVLAAPDFLR   | ERDDVNATA | ---   | ---   | LEK ROSTPSAEGIHNGYF   |
| C. carbonum xyl2              | --- | MVSEKSLIAA | VATSVLAAPDFLR   | ERDDVNATA | ---   | ---   | LEK ROSTPSAEGIHNGYF   |
| C. sativus xyl2               | --- | MVSEKSLIAA | VATSVLAAPDFLR   | ERDDVNATA | ---   | ---   | LEK ROSTPSAEGIHNGYF   |
| H. insolens xyl1              | --- | MVSLKSLIAA | VAVSSALAPDFEV   | EDN---ST  | ---   | ---   | ALQA RQVTPNAEGWHNGYF  |
| M. grisea xyl22               | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| C. gracile cpxA               | --- | MVSKALLIGA | AG---ALAFENVT   | QMN---    | ---   | ---   | EIVA RACTPSPGTNNNGYF  |
| T. reesei, ALK02721 xyl2      | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| T. reesei xyl1                | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| T. harzianum xyl2             | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| T. viride xyl                 | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| C. niger cpxB                 | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| A. niger xyl2                 | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| Penicillium sp 40 xyla        | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| Streptomyces sp xyl1          | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| Streptomyces sp xyl1          | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| S. thermocyanoviolaceus xylB  | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| S. viridosporus T7A svx2A     | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| T. fusca xyl                  | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| C. pachnodae xyl11A           | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| A. oryzae xyl1                | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| C. purpurea xyl1              | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| C. maktus xyl                 | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| P. fluorescens cellulosa xyl  | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| P. cochleariae xyl            | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| A. kawachi xylC               | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| A. niger xyl1                 | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| A. tubigenensis xyl1          | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| P. purpurogenum xylB          | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| Cryptococcus sp S-2 xyl1-CS2  | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| T. reesei xyl2                | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| B. pumilus xylA(1)            | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| B. pumilus xylA(2)            | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| C. acetobutylicum xylB        | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| C. thermocellum xylB          | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| Racilius sp 4IM-1 xylJ        | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| P. multivesiculatum xyla      | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| P. multivesiculatum xyl       | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| R. albus xyla                 | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| Caldocellulositruptor sp xylD | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| D. thermophilum xylB          | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| R. flavofaciens xyla          | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |
| P. stipitidis xyla            | --- | MVSTSVITAV | VALAGSALAPADG   | NMTG-PPFE | ---   | ---   | QEMR ROSTPSSTGRHNGYF  |





FIG. 2 CONT'D

|                                 | 271            | 285           | 286           | 300 | 301 | 315 | 316 | 330 | 331 | 345 | 346 | 360 |
|---------------------------------|----------------|---------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| B. subtilis xyla                | SNWAQVMAVEGYS  | SGSSNVTVW     | SGSSNVTVW     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| B. circulans xyla               | SNWAQVMAVEGYS  | SGSSNVTVW     | SGSSNVTVW     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| B. stearothermophilus xyla      | SNWAQVMAVEGYS  | SGSSNVTVW     | SGSSNVTVW     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A. caviae xyla                  | NSWSQVMAVEGYS  | SGSNVTVW      | SGSNVTVW      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. carbonum xyl1                | -QHYQIVAVEGYS  | TGNAQTVNCP    | TGNAQTVNCP    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| H. turcicum xyl1                | -SHYQIVAVEGYS  | SGSASTVNCP    | SGSASTVNCP    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A. pisi xyl                     | -THYQIVAVEGYS  | SGSAQTVNCA    | SGSAQTVNCA    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| S. commune xyla                 | SEHYQIVAVEGYS  | SGFARITVAVG   | SGFARITVAVG   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| T. lanuginosus xyla             | -QHYQIVAVEGYS  | SGSSDIIVQIQ   | SGSSDIIVQIQ   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. carbonum xyl2                | -QHYQIVAVEGYS  | SGSSDIIVQIQ   | SGSSDIIVQIQ   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. sativus xyl2                 | -QHYQIVAVEGYS  | SGSSDIIVQIQ   | SGSSDIIVQIQ   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| H. insolens xyl1                | -QHYQIVAVEGYS  | SGSSDIIVQIQ   | SGSSDIIVQIQ   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| M. grisea xyl22                 | -NHNMIYAVEGYS  | AGNSNINQHEA   | AGNSNINQHEA   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. gracile cpxA                 | -SHNYQIVAVEGYS | SGSSSITVS     | SGSSSITVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| T. reesei xyl2 (2)              | -TMDYQIVAVEGYS | SGSASTIVS     | SGSASTIVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| T. reesei xyl1                  | -TMDYQIVAVEGYS | SGSASTIVS     | SGSASTIVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| T. harzianum xylD               | -TMDYQIVAVEGYS | SGSASTIVS     | SGSASTIVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| T. viride xyl                   | -TMDYQIVAVEGYS | SGSASTIVS     | SGSASTIVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. gracile cpxB                 | -TRDYQIVAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A. niger xyl2                   | YHN-YQIVAVEGYS | SGSSSITVQ     | SGSSSITVQ     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Penicillium sp 40 xyla          | SFN-YQIVAVEGYS | SGSSSITVS     | SGSSSITVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Streptomyces sp xyl             | QFYVMIMAVEGYS  | SGSSNIVVSG    | SGSSNIVVSG    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Streptomyces sp xyl1            | SNYVMIMAVEGYS  | SGSSSITVS     | SGSSSITVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| S. thermocyanesciviolaceus xylB | YHN-YMILAVEGYS | SGSSNIVVSGDN  | SGSSNIVVSGDN  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| S. viridosporus F7A strA        | NHN-YMILAVEGYS | SGSSNIVVSG    | SGSSNIVVSG    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| T. fusca xyl                    | RHD-YMILAVEGYS | SGSSNIVVSG    | SGSSNIVVSG    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. pachnoda xyl1                | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A. oryzae xylG1                 | -TYDMYVAVEGYS  | SGSASTIVS     | SGSASTIVS     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. purpurea xyl1                | -NHDYVAVAVEGYS | SGSSDIIVVSGT  | SGSSDIIVVSGT  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. malxus xyl                   | -NHNQVAVAVEGYS | SGSSDIIVVSGG  | SGSSDIIVVSGG  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| P. Eluorescens cellulosa xyl    | -THAQVAVAVEGYS | SGFADIVS      | SGFADIVS      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| P. cochleariae xyl              | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A. kawachi xylC                 | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A. niger xyl1                   | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| A. tubigenensis xyl1            | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| P. purpurogenum xylB            | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cryptococcus sp S-2 xyl1-CS2    | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| T. reesei xyl2                  | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| B. pumilus xyla(1)              | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| B. pumilus xyla(2)              | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. acetobutylicum xylB          | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| C. thermocellum xylB            | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Bacillus sp 41M-1 xylJ          | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| P. multivesiculatum xyla        | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| P. multivesiculatum xyl         | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| R. albus xyla                   | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Caldicellulosiruptor sp xylD    | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| D. thermophilum xymB            | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| R. flavofaciens xyla            | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| P. stipitidis xyla              | YHN-YMILAVEGYS | SGSATVNGASDGS | SGSATVNGASDGS |     |     |     |     |     |     |     |     |     |