(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 686 288**

(51) Int. CI.:

C12N 15/56	(2006.01)	***C12P 19/02***	(2006.01)
A21D 8/04	(2006.01)	***C13K 1/02***	(2006.01)
A23K 20/189	(2006.01)	***D21C 5/00***	(2006.01)
C11D 3/386	(2006.01)	***C13K 13/00***	(2006.01)
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 9/24	(2006.01)		
C12P 19/14	(2006.01)		
D06L 4/40	(2007.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.11.2012 PCT/JP2012/080387**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13077432**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2012 E 12851111 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2784161**

(54) Título: **Xilanasa mutante, método de fabricación y uso de la misma, y método para fabricar lignocelulosa sacarificada**

(30) Prioridad:

25.11.2011 JP 2011257389
24.04.2012 JP 2012099096

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2018

(73) Titular/es:

MITSUI CHEMICALS, INC. (50.0%)
5-2, Higashi-Shimbashi 1-chome Minato-ku
Tokyo 105-7117, JP y
MEIJI SEIKA PHARMA CO., LTD. (50.0%)

(72) Inventor/es:

YANAI, HISAAKI;
TAMAI, HIROKI;
OSABE, MASAMI;
YOKOYAMA, FUMIKAZU;
OKAKURA, KAORU y
INOUE, ATSUSHI

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Xilanasa mutante, método de fabricación y uso de la misma, y método para fabricar lignocelulosa sacarificada

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de producción eficaz de un producto sacarificado a partir de una materia prima lignocelulósica. La invención también se refiere a una xilanasa mutante, un método de producción de la xilanasa mutante y usos de la xilanasa mutante.

Antecedentes técnicos

La xilanasa es una enzima que hidroliza de forma aleatoria los enlaces β-1,4 de xilano, que es un componente de las paredes de las células vegetales. Se espera que la enzima se use en una amplia gama de aplicaciones, tales como a) sacarificación de materias primas lignocelulósicas, b) blanqueo de pasta, c) aditivos de piensos animales, d) auxiliares detergentes y e) modificadores para la fabricación del pan.

Con respecto a a) sacarificación de material primas lignocelulósicas, se conoce un método para la sacarificación de una materia prima lignocelulósica en que se produce un monosacárido que sirve como sustrato de fermentación a partir de una materia prima lignocelulósica usando una enzima. Sin embargo, el coste de las enzimas tales como las celulasas y las hemicelulasas (xilanasa o similares) que pueden usarse para este método de sacarificación impide el uso parcial de este método de sacarificación. Para abordar este problema, se ha propuesto la reutilización de enzimas usadas en el método de sacarificación como un medio eficaz para la reducción de los costes del método de sacarificación (véase, por ejemplo, solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública (JP-A) n.º 2006-87319 (documento de patente 1), folleto de la publicación internacional WO 2011/065449 (documento de patente 10) y folleto del documento WO 2011/125056 (documento de patente 11)).

La xilanasa es una enzima que descompone la hemicelulosa (de la que el componente principal es β-1,4-xilano), que es uno de los componentes principales de una materia prima lignocelulósica. Por lo tanto, la xilanasa es una de las enzimas importantes en un método para sacarificar una materia prima lignocelulósica. Sin embargo, se sabe que la xilanasa tiene baja estabilidad.

Mientras tanto, la sacarificación de la materia prima lignocelulósica requiere tratamiento en una región ácida de pH 4,0 a pH 6,0 a una alta temperatura de 40 °C a 60 °C durante unos pocos días. Por tanto, la baja estabilidad de la xilanasa es un impedimento para la reutilización de esta enzima.

Una xilanasa resistente al calor mutante derivada de *Trichoderma reesei* (a partir de ahora en este documento abreviada como "*T. reesei*" (véase, por ejemplo, el documento el folleto del documento WO 2007/115391 (documento de patente 2) y el folleto del documento WO 2007/115407 (documento de patente 3)) mostró una actividad residual de un 80 % o superior incluso después del tratamiento con calor de 50 °C a 70 °C durante 30 minutos.

También se sabe que una xilanasa resistente al calor derivada de *Bacillus* (véase, por ejemplo, el documento JP-A n.º 2004-121257 (documento de patente 4)) muestra una actividad residual de un 90 % o mayor después del tratamiento con calor a 70 °C durante 30 minutos.

Respecto a b) blanqueo de pasta, se sabe que la cantidad de agente de blanqueo a usar puede disminuirse usando xilanasa en un proceso de blanqueo de pasta.

En general, el blanqueo de pasta en la industria de fabricación del papel consiste en una primera fase que es un proceso de tratamiento de deslignificación (de pH 10 a 12, 80 °C) de eliminación de la lignina de la pasta usando una enzima, y una segunda fase que es un proceso de blanqueo. La razón para realizar el proceso de blanqueo en la segunda fase como se describe anteriormente es que aproximadamente un pequeño porcentaje de lignina permanece como agente colorante en la pasta incluso después del tratamiento de deslignificación usando una enzima. Además, un proceso de permitir que funcione la xilanasa, además del proceso de tratamiento de deslignificación y el proceso de blanqueo, posibilita la descomposición de las cadenas de hemicelulosa unidas a la lignina y la celulosa. Como resultado de esto, la lignina puede retirarse de forma eficaz, y se espera que pueda obtenerse un efecto en términos de disminución de la cantidad de agente blanqueante a usar en el proceso de blanqueo.

Para realizar de forma eficaz el proceso de permitir que funcione la xilanasa, es necesario usar una xilanasa que tenga propiedades de modo que la xilanasa pueda tolerar el tratamiento a aproximadamente pH 10 y de 70 °C a 80 °C realizado durante unas pocas horas.

Una xilanasa resistente al calor mutante derivada de *T. reesei* (véanse, por ejemplo, los documentos de patente 2 y 3 y el documento WO 2001/92487 (documento de patente 5) y el documento WO 2003/046169 (documento de

patente 6)) tiene una temperatura de reacción óptima de aproximadamente 70 °C y un pH de reacción óptimo de 7 a 8, que demuestra la posibilidad de que la xilanasa mutante resistente al calor pueda usarse en un proceso de blanqueo de pasta.

Con respecto a c) aditivos de pienso para animales, el pienso para animales es rico en fibras vegetales, y las paredes de las células vegetales en el pienso animal pueden descomponerse por la adición de xilanasa. Por lo tanto, la eficacia de la absorción de los nutrientes vegetales por los animales puede mejorarse.

En casos en que el pienso para animales tiene que granularse usando xilanasa, se requiere que la xilanasa tenga estabilidad con que la xilanasa puede tolerar el tratamiento de aproximadamente 70 °C a aproximadamente 90 °C durante aproximadamente 10 minutos. Además, para que la xilanasa funcione en los órganos digestivos de los animales, la xilanasa tiene que mostrar una alta actividad en un entorno aproximadamente 40 °C y aproximadamente pH 4,8.

Muchas de las xilanasas derivadas de hongos filamentosos tales como el género *Trichoderma* y el género *Acremonium* tienen un pH óptimo de 3 a 5 y un intervalo de temperatura funcional de aproximadamente 40 °C.

Las xilanasas resistentes al calor mutantes descritas en el documento de patente 2, el documento de patente 3, el documento WO 2001/27252 (documento de patente 7), y el documento WO 2005/108565 (documento de patente 8) incluyen mutantes que tienen un pH óptimo de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5.

d) Auxiliar detergente: El uso de xilanasa como auxiliar detergente puede eliminar las pelusas de las prendas.

Como las recientes lavadoras de tambor están diseñadas para ahorrar agua, tiende a producirse una formación de pelusas finas según aumenta la cantidad de veces de lavado. Cuando se ha producido la formación de pelusas, tienden a reensuciarse las prendas.

Las pelusas pueden eliminarse usando xilanasa como auxiliar detergente y, por lo tanto, puede evitarse el reensuciado. Además, como los componentes principales de las manchas que se adhieren a las prendas y derivadas de vegetales o frutas son paredes celulares que derivan de los vegetales o frutas y a los que se adhieren los colorantes, puede realizarse un lavado eficaz usando xilanasa en el lavado incluso en casos en que se usa una lavadora de tambor de ahorro de agua.

En casos en que tiene que usarse la xilanasa como auxiliar detergente, es necesario usar una xilanasa que tenga resistencia a álcalis y resistencia a tensioactivos. Además, en casos en que se usa xilanasa en limpieza de lavandería, es necesario usar una xilanasa que funciona de forma estable en un alto intervalo de temperaturas de 50 °C a 70 °C.

Una xilanasa mutante derivada de *T. reesei* que tiene resistencia al calor y resistencia a álcali (por ejemplo, véase el documento de patente 2, el documento de patente 3, el documento de patente 5 y el documento de patente 6) tiene propiedades que incluyen una temperatura óptima de 62 °C a 75 °C y un pH óptimo de pH 7 a pH 8.

La xilanasa mutante descrita en el documento de patente 8 tiene un pH óptimo de pH 5, que está en el lado ácido. Sin embargo, esta xilanasa mutante tiene una temperatura óptima de 70 °C y mantiene un 100 % de la actividad a 60 °C y de pH 8 a pH 9 durante al menos 10 minutos.

Cada una de las xilanasas resistentes al calor y resistentes a álcali derivadas del género *Bacillus* (véanse, por ejemplo, el documento de patente 4 y el documento JP-A n.º 2007-54050 (documento de patente 9)) tiene propiedades que incluyen un intervalo de temperatura óptimo de 50 °C a 70 °C y un pH óptimo de 7 a 8, y mantiene un 100 % de la actividad a pH 9 y de 4 °C a 5 °C durante un periodo de tiempo de 1 a 2 días.

Respecto a e) modificadores para la fabricación del pan, la calidad de producción de pan puede mejorarse usando xilanasa como modificador para la fabricación del pan.

La xilanasa tiene propiedades que pueden descomponer el componente hemicelulósico de la harina. Debido a la descomposición del componente hemicelulósico por la xilanasa, se libera la humedad unida a este componente en la masa, cambiando de ese modo las propiedades de la masa. Como resultado, la estructura de las partículas y el volumen de la barra del pan producido se mejoran, dando lugar a una conservación favorable de la calidad del pan producido.

Cuando se fabrica la masa, se aplica un gran impacto físico y carga de presión durante un proceso de agitación y amasado de los ingredientes, y un proceso de fermentación requiere un periodo de tiempo de 1 a 2 horas a una temperatura de 35 °C a 40 °C.

Sumario de la invención

Problema a resolver por la invención

Sin embargo, aún hay espacio para la mejora en la reutilización de la enzima de sacarificación descrita en (a) sacarificación de materia prima lignocelulósica, desde los puntos de vista del coste de la producción de azúcares y la utilización eficaz de recursos lignocelulósicos.

En la reutilización de la enzima de sacarificación descrita en el documento de patente 1, se demuestra que la unión de la enzima a un resto lignocelulósico causa la reducción en la actividad de sacarificación de la misma. Por esta razón, las cantidades de adición de la enzima y el sustrato están significativamente limitadas.

En particular, los ejemplos de trabajo del documento de patente 1 describen que la cantidad de la enzima es una cantidad que puede descomponer un 96 % o más de la lignocelulosa en 12 horas, lo que indica que el suministro de una gran cantidad de la enzima es necesario. Por tanto, desde un punto de vista económico, la reutilización de la enzima durante un periodo largo de tiempo es necesaria.

Además, la concentración de lignocelulosa como sustrato es tan baja como de aproximadamente un 1 %, y la concentración de azúcar producido es también baja. Por lo tanto, para la utilización del azúcar en un proceso de fermentación de etanol y similares, la inversión en instalaciones para abordar la eficacia por volumen del tanque de sacarificación, la concentración antes de la producción de fermentación de etanol, y similares, es necesaria. Por tanto, este método apenas puede considerarse como un método industrial desde el punto de vista económico.

En la sacarificación de lignocelulosa que contiene hemicelulosa, se cree que una enzima que pueda descomponer la lignocelulosa a alta concentración y tolerar la reutilización durante un largo periodo de tiempo es necesaria. Por lo tanto, la baja estabilidad de la xilanasa es un problema, como se describe anteriormente.

En el documento de patente 10, se describe que la actividad de enzimas tales como celulasa y hemicelulasa se mantiene incluso después de la adsorción en los restos. El documento de patente 10 también describe un método por el que se recupera una enzima de sacarificación que se adsorbe en lignocelulosa después de la reacción y se reutiliza en una siguiente reacción de sacarificación.

Sin embargo, en el documento de patente 10, la lignocelulosa que se usará como materia prima de sacarificación se calienta, por anticipado, en condiciones ácidas, por lo que la hemicelulosa en la lignocelulosa se descompone. Por lo tanto, se incurre en gastos de calentamiento, y se necesita la instalación de un equipo tal como un recipiente de presión que tenga resistencia al ácido. Por consiguiente, este método no es favorable desde el punto de vista económico.

En vista de esto, se desea la descomposición de hemicelulosa usando xilanasa. Sin embargo, como la reacción de sacarificación se realiza durante un largo tiempo, la baja estabilidad de la xilanasa es un problema, similar al anterior.

El documento de patente 11 describe que, aumentando la cantidad de enzima de sacarificación a usar en una reacción inicial, la cantidad de enzima a suministrar adicionalmente, que corresponde a la actividad perdida en el momento de la reutilización de la enzima, puede disminuirse, y pueden disminuirse los costes globales para la enzima.

Sin embargo, de hecho, una cantidad de la enzima adicionalmente suministrada es tan grande como de 1/3 de la cantidad de la enzima suministrada inicialmente y, por lo tanto, este método no es favorable desde el punto de vista económico. Además, se describe, en los ejemplos de trabajo proporcionados en el documento de patente 11, que los restos de reacción se desechan. La pérdida de la enzima adsorbida en los restos es un factor principal que hace imposible disminuir la cantidad de la enzima a suministrar adicionalmente.

Además, los ejemplos de trabajo proporcionados en el documento de patente 11 describen únicamente el uso de celulosa incluida en lignocelulosa, concretamente el uso de glucosa. La paja de trigo usada en los ejemplos de trabajo proporcionados en el documento de patente 11, que se ha sometido a pretratamiento, contiene hemicelulosa y similares en una cantidad de un 35 % o más. Desde los puntos de vista de uso eficaz de recursos de lignocelulosa y la economía, es necesario usar, como monosacárido, la xilosa contenida en la hemicelulosa. En este caso, sin embargo, la baja estabilidad de la xilanasa es un problema en una situación en que la enzima se reutiliza después de largas horas de reacción, que se espera que incluya procesos desde la sacarificación hasta la fermentación de etanol.

Las soluciones a esto pueden incluir la utilización de una xilanasa termoestable preparada por la mejora de una xilanasa existente y la utilización de una xilanasa resistente al calor derivada de una bacteria resistente al calor. Sin embargo, hasta ahora, no ha habido informes acerca de utilización de enzimas a largo plazo usando estas xilanasas.

Es incierto si los mutantes de xilanasa resistentes al calor de *T. reesei* divulgados en el documento de patente 2 y el documento de patente 3 mencionados en (a) sacarificación de materia prima lignocelulósica satisfacen o no las

condiciones requeridas para la sacarificación de una materia prima lignocelulósica (su uso a largo plazo en una región ácida a altas temperaturas).

Además, respecto a la xilanasa resistente al calor que se obtiene del género *Bacillus* y que se describen en el documento de patente 4 mencionado en (a), se divulgan los resultados de actividad residual de la misma tras el tratamiento con calor a pH 7,2, que está cercano a pH neutro. Por lo tanto, probablemente la actividad de la xilanasa resistente al calor disminuye cuando la xilanasa resistente al calor se ha usado en condiciones ácidos durante unos pocos días para realizar la sacarificación de lignocelulosa.

En el documento de patente 2, el documento de patente 3, el documento de patente 5 y el documento de patente 6, que se refieren a mutantes de xilanasa resistentes al calor derivadas de *T. reesei* y mencionadas en (b) blanqueo de pasta, los datos son acerca de la actividad residual de la xilanasa resistentes al calor derivadas de *T. reesei* después de tratar las xilanasas resistentes al calor derivadas de *T. reesei* a pH 5 y de 60 °C a 80 °C durante 30 minutos. Sin embargo, la estabilidad de las xilanasas resistentes al calor derivadas de *T. reesei* en condiciones que estimulan el blanqueo de pasta (a pH 10 y de 70 °C a 80 °C durante unas pocas horas) no está demostrada-

Las xilanasas derivadas de hongos filamentosos tales como el género *Trichoderma* y el género *Acremonium* mencionados en (c) aditivos de pienso para animales no tienen estabilidad térmica que puedan tolerar la granulación.

Además, entre los mutantes de xilanasa resistentes al calor divulgados en el documento de patente 2, documento de patente 3, el documento de patente 7 y el documento de patente 8 mencionados en (c), se incluyen mutantes que tienen un pH óptimo de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5. Sin embargo, todos los mutantes experimentan inactivación térmica significativa a un intervalo de alta temperatura de 60 °C o mayor y, por lo tanto estos mutantes no pueden usarse como aditivos de piensos para animales.

Respecto a los mutantes de xilanasa resistentes al calor y resistentes a álcali derivados de *T. reesei* divulgados en el documento de patente 2, el documento de patente 3, el documento de patente 5 y el documento de patente 6 mencionados en (d) auxiliar detergente, no hay información acerca de la estabilidad de los mutantes de xilanasa resistentes a álcali en una región básica sobre un periodo de tiempo generalmente necesario para el lavado (de 1 a 2 horas). Por tanto, no está claro si estas xilanasas mutantes pueden usarse o no como auxiliares detergentes.

De forma similar a lo anterior, no está claro si el mutante de xilanasa divulgado en el documento de patente 8 y las xilanasas resistentes al calor y resistentes a álcali derivadas del género *Bacillus* y divulgadas en el documento de patente 4 y el documento de patente 9, que se mencionan en (d), pueden tolerar o no el uso como auxiliar de detergente en limpieza de lavandería.

No está claro si los mutantes de xilanasa resistente al calor derivadas de *T. reesei* y divulgados en el documento de patente 2, el documento de patente 3, el documento de patente 5 y el documento de patente 6, que se mencionan en (e) modificador para la fabricación del pan, pueden tolerar o no un gran impacto físico y carga de presión aplicados durante la fabricación del pan.

Además, los procesos para la fabricación del pan incluyen un proceso de fermentación realizado a 35 °C hasta 40 °C durante 1 a 2 horas. Por tanto, la compatibilidad con este proceso también es necesaria.

Como se describe anteriormente, la gama de usos en que puede usarse xilanasa es amplia. Por lo tanto, las condiciones necesarias para la xilanasa varían ampliamente. Los ejemplos de las mismas incluyen varias condiciones en que las enzimas se inactivan fácilmente, tal como la condición que implica un pH de 4 a 10, una temperatura de 40 °C a 80 °C y un tiempo de uso de varios días.

Para abordar estas diversas necesidades, se ha informado de muchos tipos de xilanasas mutantes y xilanasas novedosas. Sin embargo, las xilanasa pueden funcionar con suficiente estabilidad en condiciones intensas en que las enzimas se inactiven fácilmente no se han encontrado.

Las xilanasas mutantes obtenidas para mejorar la resistencia al calor tienen un problema de que la velocidad inicial de reacción disminuye en gran medida. Se presupone que la razón de ello es una disminución en la flexibilidad estructural de la proteína completa causada por mutaciones o similares de la secuencia de aminoácidos que se ha introducido para mejorar la resistencia al calor.

En dichas circunstancias, el desarrollo de una xilanasa que muestra actividad estable durante un periodo determinado de tiempo en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente tal como una región ácida (de pH 4 a 6), una región básica (de pH 8 a 10) o un intervalo de alta temperatura (de 40 °C a 80 °C) y con la que la velocidad inicial de reacción no se reduzca significativamente en comparación con una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma.

La presente invención pretende proporcionar un método de sacarificación barato y eficaz para lignocelulosa usando

una xilanasa termoestable. La invención también pretende proporcionar una xilanasa mutante que tenga un resto de aminoácido sustituido y que muestre actividad estable incluso en condiciones intensas en que las enzimas de inactivan fácilmente, y que proporcione una velocidad inicial de reacción no reducida significativamente en comparación con una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la xilanasa mutante. La invención también pretende proporcionar un método de producción que pueda producir la xilanasa mutante a bajo coste, así como proporcionar diversos usos de la xilanasa mutante.

Medios para resolver el problema

La presente invención incluye lo siguiente:

[1] Un método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa, incluyendo el método poner en contacto una materia prima lignocelulósica con la xilanasa termoestable definida a continuación.
[2] El método de producción de un producto sacarificado de acuerdo con [1], en el que la materia prima lignocelulósica es pasta.
[3] Un método de producción del producto sacarificado, incluyendo el método:

recuperar la xilanasa termoestable de una solución de reacción de sacarificación que contiene el producto sacarificado de lignocelulosa obtenido por el método de producción de un producto sacarificado de acuerdo con [1] o [2]; y
poner en contacto la xilanasa termoestable recuperada con una materia prima lignocelulósica, para producir un producto sacarificado.

[4] El método de producción de un producto sacarificado de acuerdo con [3], en el que la solución de reacción de sacarificación se somete a separación de sólido-líquido usando centrifugación o una membrana de microfiltración, y el líquido separado se ultrafiltra usando una membrana de ultrafiltración para separar y recuperar el producto sacarificado de lignocelulosa y la xilanasa termoestable.
[5] El método de producción de un producto sacarificado de acuerdo con [4], en el que el método incluye poner en contacto un sólido obtenido por la separación de sólido-líquido usando centrifugación o una membrana de microfiltración y la xilanasa termoestable recuperada usando la membrana de ultrafiltración con una materia prima lignocelulósica, para producir un producto sacarificado.
[7] Una xilanasa mutante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con al menos las siguientes sustituciones de restos de aminoácido:
el resto de asparagina en la posición 29 está sustituido con leucina;
el resto de lisina en la posición 58 está sustituido con arginina;
el resto de tirosina en la posición 27 está sustituido con fenilalanina; y
el resto de asparagina en la posición 44 está sustituido con serina;

y que comprende opcionalmente de 1 a 10 sustituciones de restos de aminoácido adicionales en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;
en la que dicha xilanasa mutante es una xilanasa mutante que proporciona una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por la SEQ ID NO: 1, y que tiene una actividad xilanasa después de tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.
[19] Un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante de acuerdo con [7].
[20] Un vector de expresión que incluye el ácido nucleico de acuerdo con [19].
[21] Un transformante que incluye el vector de expresión de acuerdo con [20].
[22] El transformante de acuerdo con [21], en el que una célula hospedadora del transformante es una célula derivada de *Escherichia coli, Bacillus subtilis,* levadura, un actinomiceto o un hongo filamentoso.
[23] El transformante de acuerdo con [22], en el que el hongo filamentoso pertenece al género *Trichoderma*, al género *Acremonium*, al género *Humicola* o al género *Aspergillus*.
[24] El transformante de acuerdo con [22] o [23], en el que el hongo filamentoso es *Trichoderma viride*, *Acremonium cellulolyticus*, *Humicola insolens* o *Aspergillus niger*.
[25] Un método de producción de una xilanasa mutante, incluyendo el método cultivar el transformante de acuerdo con una cualquiera de [21] a [24] y recuperar la xilanasa mutante de acuerdo con [7] de al menos uno del transformante cultivado o un producto de cultivo del transformante.
[26] Una xilanasa mutante producida por el método de producción de acuerdo con [25].
[27] Una composición que incluye la xilanasa mutante de acuerdo con [7] y [21].
[28] Un método de blanqueo de una pasta, incluyendo el método poner en contacto la xilanasa mutante de acuerdo con [7] y [21] con la pasta.
[29] Un detergente que incluye la xilanasa mutante de acuerdo con [7] y [21].[30] Un pienso para animales que incluye la xilanasa mutante de acuerdo con [7] y [21].
[31] Un modificador para la fabricación del pan que incluye la xilanasa mutante de acuerdo con [7] y [21].

Efectos ventajosos de la invención

De acuerdo con la presente invención, puede proporcionarse un método de sacarificación barato y eficaz para lignocelulosa usando una xilanasa termoestable. Además, también puede proporcionarse una xilanasa mutante que tiene un resto de aminoácido sustituido, y que muestra actividad estable incluso en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente, y que proporciona una velocidad inicial de reacción no reducida significativamente en comparación con una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la xilanasa mutante. Además, de acuerdo con la invención, puede proporcionarse un método de producción que puede producir la xilanasa mutante a bajo coste, y también pueden proporcionarse diversos usos de la xilanasa mutante.

Descripción de realizaciones

Una xilanasa termoestable puede ser cualquier xilanasa termoestable cuya actividad xilanasa después del tratamiento con calor durante un periodo especificado de tiempo está al mismo nivel que el de la actividad xilanasa antes del tratamiento con calor, o de la que una reducción en la actividad xilanasa de la misma después del tratamiento con calor en comparación con la actividad xilanasa antes del tratamiento con calor es pequeña.

Los ejemplos de ello incluyen xilanasas obtenidas de hongos filamentosos del género *Aspergillus*, el género *Trichoderma*, el género *Aureobasidium*, el género *Schizophyllum commune* o similares, y bacterias del género *Bacillus*, el género *Clostridium* y el género *Streptomyces*.

Entre las xilanasas de tipo silvestre descritas anteriormente, se prefieren aquellas que muestran una actividad xilanasa después de tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas que es al menos un 50 % de la actividad xilanasa de la mismas antes del tratamiento con calor.

Además, una xilanasa termoestable puede ser una xilanasa mutante obtenida introduciendo una mutación en una xilanasa de tipo silvestre, tales como las obtenidas de hongos filamentosos y bacterias, para mejorar la estabilidad térmica, según lo necesario. La xilanasa mutante es, más preferiblemente, una xilanasa mutante que tiene una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma, y de la que la actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas es al menos un 50 % de su actividad xilanasa de la misma antes del tratamiento con calor, y que incluye un aminoácido sustituido.

Un ácido nucleico de acuerdo con la invención es un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica una secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante descrita anteriormente.

Un vector de expresión de acuerdo con la invención incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica una secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante.

Una célula hospedadora de acuerdo con la invención es una célula que se transforma con el vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica una secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante.

Un método de producción de una xilanasa mutante de acuerdo con la invención incluye cultivar la célula hospedadora y recoger la xilanasa mutante de al menos uno de la célula hospedadora o un producto de cultivo de la célula hospedadora. La xilanasa mutante de acuerdo con la invención también incluye una xilanasa mutante producida por el método descrito anteriormente de producción de una xilanasa mutante.

Una composición de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante.

Un método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa de acuerdo con la invención incluye poner en contacto la xilanasa mutante con una materia prima lignocelulósica.

Un método de blanqueo de pasta de acuerdo con la invención incluye poner en contacto la xilanasa mutante con la pasta.

Un detergente, un pienso para animales o un modificador para la fabricación del pan de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante.

Descripciones a cerca de una secuencia de aminoácidos y una secuencia de bases que codifica la xilanasa mutante o secuencias individuales de cebadores tendrán aplicación a las secuencias mencionadas respectivas, así como a secuencias complementarias a las mismas, basándose en la relación mutuamente complementaria entre las mismas, salvo que se especifique lo contrario. Cuando las descripciones de la invención se aplican a las secuencias complementarias a las secuencias respectivas mencionadas, las descripciones se interpretarán, durante toda la memoria descriptiva, como si las secuencias reconocidas por las secuencias complementarias fueran secuencias complementarias a las secuencias correspondientes mencionadas en la presente memoria descriptiva, dentro de

una serie de conocimientos técnicos habituales de los expertos en la materia.

Como se usa en este documento, el alcance del término "proceso" incluye no solamente un proceso independiente, sino también un proceso que no se distingue claramente de otros procesos, siempre que se consiga el propósito esperado del proceso.

En la memoria descriptiva, el intervalo numérico indicado por "(de)...a..." indica un intervalo que incluye los valores numéricos descritos antes y después de "a" como los valores mínimo y máximo, respectivamente.

La memoria descriptiva, cuando están presentes dos o más sustancias, cada una correspondiente a un componente particular de una composición, la cantidad del componente particular en la composición significa la cantidad total de las dos o más sustancias presentes en la composición, salvo que se especifique lo contrario.

A partir de ahora en este documento se describirá la invención.

(1) Definiciones

[Definiciones de actividad xilanasa y velocidad inicial de reacción]

En la invención, la expresión "actividad xilanasa" significa la producción de un oligosacárido que tiene un extremo reductor (a partir de ahora en este documento también mencionado simplemente como "azúcar reductor") mediante hidrólisis aleatoria de enlaces β-1,4 de xilano, que constituye principalmente las paredes de las células vegetales.

En la invención, la expresión "velocidad inicial de reacción" significa una velocidad inicial de reacción de la actividad xilanasa.

La velocidad inicial de reacción puede determinarse de la siguiente manera. En primer lugar, en una solución de tampón citrato de sodio 100 mM (pH 4,5), se mezcla vigorosamente xilano de abedul al 1 % (p/p) (fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC), que es un sustrato. Después, se realizó centrifugación a 5000 xg durante 15 minutos, para preparar un sobrenadante a partir del cual se puede retirar el xilano residual presente en la solución de tampón citrato de sodio. A continuación, en el sobrenadante como solución de sustrato, se mezcla la xilanasa en una cantidad de un 0,1 % (p/p) con respecto a la solución de sustrato. Se permite que la mezcla reaccione mientras se agita a 45 ºC durante 30 minutos, y se mide la cantidad de sacárido reductor en la solución de reacción obtenida por el método DNS (Bailey et al., 1992), mediante lo que puede obtenerse la velocidad inicial de reacción de la actividad xilanasa.

[Definición de actividad equivalente a la de tipo silvestre]

Como se usa en este documento, la expresión "actividad equivalente a la de tipo silvestre" significa que la velocidad inicial de reacción de una xilanasa mutante es de 0,7 (70 %) o mayor con la condición de que la velocidad inicial de reacción de la xilanasa de tipo silvestre de la misma se asuma en 1.

[Definición de intervalo en que la enzima trabaja de forma estable]

Como se usa en este documento, la expresión "intervalo en que la enzima trabaja de forma estable" significa un intervalo que tiene una temperatura mayor de 30 ºC, pero inferior a 40 ºC y un pH mayor que 6, pero más pequeño que 8.

Como se usa en este documento, la expresión "condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente" significa una región ácida (de pH 4 a pH 6), una región básica (de pH 8 a pH 10) y una región de alta temperatura (de 40 ºC a 80 ºC).

[Definición de actividad residual y estabilidad]

Como se usa en este documento, la expresión "actividad residual" se refiere al cociente, expresado en porcentaje, obtenido por dividir una velocidad inicial de reacción después de exponer una enzima durante un cierto periodo de tiempo a una condición fuera del intervalo en que la enzima trabaja de forma estable, por una velocidad inicial de reacción antes de la exposición. Un método de medición específico es el siguiente: después de realizar tratamiento con calor a 50 ºC y pH 4,5 durante periodos variados de 16 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas, se realiza reposo en hielo durante 5 minutos, y se mide la velocidad inicial de reacción. También se mide la velocidad inicial conseguida por la enzima antes del tratamiento con calor. Después, se realiza el cálculo de la división y el valor resultante se expresa en porcentaje. Además de lo anterior, se miden las actividades residuales de la misma manera con respecto a las velocidades iniciales de reacción después de realizar el tratamiento con calor a 50 ºC durante 1 hora a pH 8, pH 9 y pH 10, respectivamente, las velocidades iniciales de reacción después de realizar tratamiento con calor a 60 ºC durante 1 hora a pH 8, pH 9 y pH 10, respectivamente, y una velocidad inicial de reacción después de realizar tratamiento con calor a 70 ºC y pH 5,5 durante 5 minutos.

En la presente memoria descriptiva, se determina la estabilidad por el grado de actividad residual observada cuando la enzima se ha expuesto a condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente.

(2) Xilanasa mutante de acuerdo con la invención

La xilanasa mutante de acuerdo con la invención proporciona una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma, que tiene una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor y que tiene los restos de aminoácidos sustituidos especificados en la reivindicación 1. Como la xilanasa mutante de acuerdo con la invención tiene restos de aminoácidos sustituidos, la xilanasa mutante muestra actividad estable incluso en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente, y la velocidad inicial de reacción de la misma no se reduce significativamente en comparación con la xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma.

La xilanasa mutante de acuerdo con la invención proporciona una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma, y que tiene una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor, y que tiene restos de aminoácidos sustituidos como se define anteriormente, y no está particularmente limitada en otros aspectos.

Cuando la velocidad inicial de reacción es de un 70 % o superior, la cantidad de la xilanasa mutante a usar no llega a ser grande en comparación con la cantidad de uso de una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la xilanasa mutante y, por lo tanto, una velocidad inicial de reacción de un 70 % o superior es preferible en aplicaciones industriales.

La actividad xilanasa de la xilanasa mutante de acuerdo con la invención después de tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas es preferiblemente de al menos un 50 %, y más preferiblemente de al menos un 70 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

Una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas de al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor es preferible porque la xilanasa mutante puede usarse en un intervalo en que la enzima trabaja de forma estable. Específicamente, en casos en que se necesita una reacción enzimática durante un largo tiempo tal como sacarificación de lignocelulosa o reutilización de una enzima, una actividad xilanasa después del tratamiento con calor que satisface la condición anterior elimina la necesidad de añadir una gran cantidad de la enzima para mantener una velocidad inicial de reacción de la misma observa al inicio de la reacción, evitando de ese modo un aumento en el coste; por tanto, una actividad xilanasa después del tratamiento con calor que satisfaga la condición anterior es preferible también desde el punto de vista económico.

El origen de la xilanasa mutante no está particularmente limitado. Los ejemplos de la xilanasa mutante incluyen aquellas derivadas de *Bacillus subtilis*, una bacteria del género *Clostridium*, un actinomiceto, un hongo filamentoso y un basidiomiceto. Desde el punto de vista de aplicaciones industriales, las xilanasas mutantes derivadas del género *Trichoderma*, el género *Acremonium*, el género *Humicola* o el género *Aspergillus*, entre los hongos filamentosos, son preferibles. Desde el punto de vista de la producción en masa, las xilanasas mutantes derivadas de *Trichoderma viride*, *Acremonium cellulolyticus*, *Humicola insolens* o *Aspergillus niger* son más preferibles.

Se proporcionan las xilanasas mutantes más preferibles que incluyen las dos xilanasas mutantes descritas a continuación, desde los puntos de vista de la actividad estable que se muestra incluso en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente, y de una velocidad inicial de reacción no reducida significativamente en comparación con una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma.

La xilanasa mutante de la invención se obtiene de xilanasa de *Trichoderma viride* desde el punto de vista de la velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma, y de la actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas que es de al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

La xilanasa mutante tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias con los siguientes restos de aminoácidos sustituidos: un resto de leucina sustituido en el resto de asparagina en la posición 29; un resto de arginina sustituido en el resto de lisina en la posición 58; un resto de fenilalanina sustituido en el resto de tirosina en la posición 27; y un resto de serina sustituido en el resto de asparagina en la posición 44; en la que la xilanasa es termoestable y proporciona una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma, y tiene una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias es una secuencia de aminoácidos que codifica la xilanasa II de *Trichoderma viride*.

Una segunda xilanasa mutante puede ser una xilanasa mutante derivada de xilanasa de un hongo filamentoso que pertenece al género *Acremonium*.

La segunda xilanasa mutante es preferiblemente una xilanasa mutante derivada de xilanasa de *Acremonium cellulolyticus* desde el punto de vista de que la velocidad inicial de reacción es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma y de que la actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

La secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias es una secuencia de aminoácidos que codifica la xilanasa I de *Acremonium cellulolyticus*.

La segunda xilanasa mutante preferiblemente incluye al menos un resto de aminoácido sustituido en la posición 154 que es un resto de metionina sustituido en un resto de leucina, desde el punto de vista de facilitar que se consiga una velocidad inicial de reacción de al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma, y que se consiga una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 ºC durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

Los ejemplos específicos de la xilanasa mutante de acuerdo con la invención incluyen aquellos que tienen un resto de aminoácido sustituido y representado por el clon n.º 1 mostrado en la tabla 1. Sin embargo, la xilanasa mutante de acuerdo con la invención no está limitada a ello.

Tabla 1

Clon n.º	Secuencia n.º (tipo silvestre)	Posición del resto de aminoácido sustituido	Antes de la mutación	Después de la mutación
1	1	27	Tyr	Phe
	1	29	Asn	Leu
	1	44	Asn	Ser
	1	58	Lys	Arg
2	2	30	Ile	Val
3	2	33	Asn	Asp
4	2	36	Gly	Arg
5	2	59	Ser	Thr
6	2	90	Thr	Ser
7	2	132	Gln	Arg
8	2	154	Leu	Met
9	2	174	Ser	Thr
10	2	195	Pro	His
11	2	197	Ser	Asn
12	2	217	Gly	Glu
13	2	239	Tyr	His
14	2	242	Cys	Ser
15	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
	2	90	Thr	Ser
	2	132	Gln	Arg
	2	154	Leu	Met
	2	174	Ser	Thr
	2	195	Pro	His
	2	197	Ser	Asn
	2	217	Gly	Glu
16	2	30	Ile	Val
	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
	2	154	Leu	Met
17	2	30	Ile	Val
	2	59	Ser	Thr
	2	154	Leu	Met
	2	239	Tyr	His
	2	242	Cys	Ser

En la tabla 1, desde el punto de vista de proporcionar una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma y una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 °C durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del

tratamiento con calor, es preferible una xilanasa mutante TVX01 (clon n.º 1), una xilanasa mutante ACX01 (clon n.º 15) una xilanasa mutante ACX02 (clon n.º 16) o una xilanasa mutante ACX03 (clon n.º 17).

La xilanasa mutante TVX01 incluye los siguientes restos de aminoácido sustituidos incorporados en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias: un resto de leucina sustituido en un resto de asparagina en la posición 29, un resto de arginina sustituido en un resto de lisina en la posición 58, un resto de fenilalanina sustituido en un resto de tirosina en la posición 27 y un resto de serina sustituido en un resto de asparagina en la posición 44. La xilanasa mutante TVX01 es preferible desde los puntos de vista de proporcionar una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma y una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 °C durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

La xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención tiene actividad en un intervalo de preferiblemente 30 °C a 90 °C, y más preferiblemente de 30 °C a 70 °C. Además, la xilanasa mutante TVX01 tiene actividad en un intervalo de preferiblemente pH 3 a 9 y más preferiblemente de pH 4 a 7.

La xilanasa mutante ACX01 incluye un resto de aminoácido sustituido que es un resto de ácido aspártico sustituido en un resto de asparagina en la posición 33, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de arginina sustituido en una resto de glicina en la posición 36, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de serina sustituido en un resto de treonina en la posición 90, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de arginina sustituido en un resto glutamina en la posición 132, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de metionina sustituido en un resto de leucina en la posición 154, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de treonina sustituido en un resto de serina en la posición 174, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de histidina sustituido en un resto de prolina en la posición 195, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de asparagina sustituido en un resto de serina en la posición 197 y un resto de aminoácido sustituido que es un resto de ácido glutámico sustituido en un resto de glicina en la posición 217. La xilanasa mutante ACX01 es preferible desde los puntos de vista de proporcionar una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma y una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 °C durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

La xilanasa mutante ACX01 tiene actividad en un intervalo de preferiblemente 30 °C a 80 °C, y más preferiblemente de 30 °C a 65 °C. Además, la xilanasa mutante ACX01 tiene actividad en un intervalo de preferiblemente pH 2 a 8 y más preferiblemente de pH 2 a 5.

La xilanasa mutante ACX02 incluye un resto de aminoácido sustituido que es un resto de valina sustituido en un resto de isoleucina en la posición 30, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de ácido aspártico sustituido en un resto de asparagina en la posición 33, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de arginina sustituido en un resto de glicina en la posición 36, y un resto de aminoácido sustituido que es un resto de metionina sustituido en un resto de leucina en la posición 154. La xilanasa mutante ACX02 es preferible desde los puntos de vista de proporcionar una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma y una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 °C durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

La xilanasa mutante ACX02 tiene actividad en un intervalo de preferiblemente 30 °C a 80 °C, y más preferiblemente de 30 °C a 65 °C. Además, la xilanasa mutante ACX02 tiene actividad en un intervalo de preferiblemente pH 2 a 8 y más preferiblemente de pH 2 a 5.

La xilanasa mutante ACX03 incluye un resto de aminoácido sustituido que es un resto de valina sustituido en un resto de isoleucina en la posición 30, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de treonina sustituido en un resto de serina en la posición 59, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de metionina sustituido en un resto de leucina en la posición 154, un resto de aminoácido sustituido que es un resto de histidina sustituido en un resto de tirosina en la posición 239 y un resto de aminoácido sustituido que es un resto de serina sustituido en un resto de cisteína en la posición 242. La xilanasa mutante ACX03 es preferible desde los puntos de vista de proporcionar una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma y una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 °C durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

La xilanasa mutante ACX03 tiene actividad en un intervalo de preferiblemente 30 °C a 80 °C, y más preferiblemente de 30 °C a 65 °C. Además, la xilanasa mutante ACX03 tiene actividad en un intervalo de preferiblemente pH 2 a 8 y más preferiblemente de pH 2 a 5.

También se describen xilanasas mutantes que consisten en las secuencias de aminoácidos homólogas a la xilanasa mutante TVX01.

Las "secuencias de aminoácidos homólogas a las mismas" pueden ser, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que muestran un nivel aproximadamente equivalente de actividad xilanasa que la de la xilanasa mutante TVX01. Los

ejemplos preferibles incluyen xilanasas mutantes que tienen una homología de un 80 % o mayor, más preferiblemente un 90 % mayor y aún más preferiblemente un 95 % o mayor, con la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante TVX01. Se considera una homología de un 80 % o mayor para proporcionar una mayor similitud entre las estructuras estéricas de las xilanasas, proporcionando de ese modo una ventaja de que, por ejemplo, una xilanasa mutante que muestre un nivel aproximadamente equivalente de actividad al de este documento puede desarrollarse introduciendo uno o más sitios de mutación aclarados por la divulgación.

Lo mismo se aplica las xilanasa mutantes ACX01, ACX02 y ACX03, además de la xilanasa mutante TVX01.

En la xilanasa mutante TVX01, puede introducirse una inserción, eliminación o sustitución adicional de uno o más restos de aminoácido en la secuencia de aminoácidos que codifica la xilanasa mutante TVX01, siempre que el mutante tenga un nivel aproximadamente equivalente de actividad al de la xilanasa mutante TVX01.

En casos en que se insertan, eliminan o sustituyen uno o más restos de aminoácido, la posición o posiciones de inserción, eliminación o sustitución pueden seleccionarse libremente siempre que no se alteren los efectos ejercidos por la invención. La cantidad de restos aminoácido que se insertan, eliminan o sustituyen puede ser un resto de aminoácido, o dos o más restos de aminoácido, por ejemplo, de un resto de aminoácido a diez restos de aminoácido, preferiblemente de un resto de aminoácido a cinco restos de aminoácido. Los ejemplos específicos incluyen: una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de glicina en la posición 47 con un resto de cisteína se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de glutamina en la posición 52 con un resto de lisina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de valina en la posición 59 con un resto de isoleucina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de asparagina en la posición 67 con un resto de ácido aspártico se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de asparagina en la posición 69 con un resto de isoleucina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de serina en la posición 80 con un resto de alanina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de asparagina en la posición 97 con un resto de ácido aspártico se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de leucina en la posición 105 con un resto de metionina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de treonina en la posición 109 con un resto de alanina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de treonina en la posición 120 con un resto de arginina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de treonina en la posición 143 con un resto de isoleucina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de asparagina en la posición 151 con un resto de serina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de serina en la posición 161 con un resto leucina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias; y una xilanasa mutante en que las mutaciones en los cuatro sitios, así como la sustitución de un resto de serina en la posición 186 con un resto de treonina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias;

Lo mismo se aplica a las xilanasa mutantes ACX01, ACX02 y ACX03, además de la xilanasa mutante TVX01. Los ejemplos específicos incluyen: una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX01, así como la sustitución de un resto de serina en la posición 133 con un resto de asparagina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias, y una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX01, así como la sustitución de un resto de glutamina en la posición 176 con un resto de arginina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias.

Asimismo, respecto a la xilanasa mutante ACX02 muchos mutantes que tienen todos los sitios de mutación definidos en ACX02 muestran propiedades aproximadamente equivalentes a las de ACX02. Los ejemplos específicos de las mismas incluyen: una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de treonina en la posición 90 con un resto de serina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de glutamina en la posición 132 con un resto de arginina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de serina en la posición 133

con un resto de asparagina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de serina en la posición 174 con un resto de treonina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de prolina en la posición 195 con un resto de histidina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de glutamina en la posición 176 con un resto de arginina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias; una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de serina en la posición 197 con un resto de asparagina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias; y una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX02 así como la sustitución de un resto de glicina en la posición 217 con un resto de ácido glutámico se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias.

Además, muchos mutantes que tienen todos los sitos de mutación definidos en la xilanasa mutante ACX03 muestran propiedades aproximadamente equivalentes a las de ACX03. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen una xilanasa mutante en que los sitios de mutación definidos en ACX03, así como la sustitución de un resto de glutamina en la posición 176 con un resto de arginina se han introducido en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias.

La xilanasa mutante de acuerdo con la invención puede sintetizarse de acuerdo con métodos conocidos. Los ejemplos de un método para generar una mutación en un gen incluyen mutagénesis dirigida al sitio (Kramer, W. y frita, H.J., Methods in Enzymology, vol. 154, pág. 350 (1987)), PCR recombinante (PCR Technology, Stockton Press (1989)), síntesis química de ADN de un sitio específico, tratamiento con hidroxilamina del gen y un método que incluye tratar un microorganismo que tiene el gen con radiación UV o un agente químico, tal como nitrosoguanidina o ácido nitroso. Entre los métodos para obtener la xilanasa mutante de acuerdo con la invención, los métodos preferibles incluyen el método de producir una xilanasa mutante descrita a continuación.

(3) Método de producción de xilanasa mutante

Un método de producción de una xilanasa mutante de acuerdo con la invención (a partir de ahora en este documento mencionado simplemente como "método de producción") incluye cultivar un transformante y recuperar la xilanasa mutante de al menos uno del transformante cultivado o un producto de cultivo del transformante.

En esta ocasión, el término "transformante" se refiere a un transformante transformado con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante.

Un método de producción de una xilanasa mutante te acuerdo con la invención incluye cultivar un transformante transformado con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante, para producir la xilanasa mutante. Con este método de producción, puede producirse a bajo coste una xilanasa mutante que muestra actividad estable incluso en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente, y que proporciona una velocidad inicial de reacción no reducida significativamente en comparación con una xilanasa de tipo silvestre correspondiente a la misma.

Los procesos que pueden incluirse en el método de producción se describen a continuación. El método de producción de una xilanasa mutante de acuerdo con la invención incluye un proceso de cultivo de un transformante transformado con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante (un proceso de cultivo de células hospedadoras) y un proceso de recuperación de la xilanasa mutante de al menos uno del transformante cultivado o un producto de cultivo de transformante (un proceso de recuperación de xilanasa mutante). El método de producción de una xilanasa mutante de acuerdo con la invención puede incluir además otros procesos, según lo necesario.

A. Proceso de cultivo de transformantes

El proceso de cultivo de transformantes es un proceso de cultivo de un transformante transformado con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante.

[Transformante]

En el método de producción de acuerdo con la invención, el transformante se transforma con un vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante, y el transformante no está particularmente limitado en otros aspectos.

Los ejemplos del transformante incluyen células hospedadoras derivadas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, levaduras, actinomicetos, hongos filamentosos o similares. Entre ellos, los transformantes de los que se obtienen las células hospedadoras de *Bacillus subtilis*, levaduras, actinomicetos u hongos filamentosos, que posibilitan cada uno la producción de la enzima diana por secreción al exterior de sus células, son preferibles desde el punto de vista de aplicaciones industriales.

Los ejemplos de las levaduras incluyen aquellas que pertenecen al género *Saccharomyces*, el género *Hansenula* o el género *Pichia*. Un ejemplo de levaduras preferibles es *Saccharomyces cerevisiae*.

Los ejemplos de hongos filamentosos incluyen aquellos que pertenecen al género *Humicola*, el género *Aspergillus*, el género *Trichoderma* o el género *Acremonium*. Los ejemplos preferibles de hongos filamentosos son *Humicola insolens, Aspergillus niger, Aspergillus oryzae, Trichoderma viride* o *Acremonium cellulolyticus*. Desde el punto de vista de aplicaciones industriales, es más preferible *Trichoderma viride, Acremonium cellulolyticus, Humicola insolens* o *Aspergillus niger*.

[Ácido nucleico]

El ácido nucleico descrito anteriormente está representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante.

Los ejemplos de métodos para sintetizar la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante incluyen un método de introducción de uno o más sitios de mutación en una secuencia de bases que codifica una xilanasa de tipo silvestre correspondiente, y un método de síntesis química de la secuencia de bases completa que incluye uno o más sitios de mutación. El método de introducción de uno o más sitios de mutación en una secuencia de bases que codifica una xilanasa de tipo silvestre correspondiente se describe a continuación usando una secuencia de bases que codifica una xilanasa I de *Acremonium cellulolyticus* y una secuencia de bases que codifica una xilanasa II de *Trichoderma viride*. Sin embargo, el ácido nucleico de acuerdo con la invención no está limitado a ello.

[Introducción de sitios de mutación en la secuencia de bases que codifica la xilanasa de tipo silvestre]

Los ejemplos de las secuencias de bases que codifican las xilanasas de tipo silvestre incluyen una secuencia de bases que codifica la xilanasa I de *Acremonium cellulolyticus* representada por la SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias y una secuencia de bases que codifica la xilanasa II de *Trichoderma viride* representada por la SEQ ID NO: 4 en el listado de secuencias.

Los ejemplos de un método de generación de una mutación en un gen usando una secuencia de bases que codifica una xilanasa de tipo silvestre tal como las mencionadas anteriormente como molde incluyen un método de mutagénesis dirigida al sitio (Kramer, W. y Frita H.J., Methods in Enzymology, vol. 154, pág. 350 (1987)), un método de PCR recombinante (PCR Technology, Stockton Press (1989)), un método de síntesis química de una parte particular de un ADN, un método de tratamiento de un gen con hidroxilamina, un método de someter un microorganismo que tiene el gen a tratamiento por radiación UV o a tratamiento con un agente químico tal como nitrosoguanidina o ácido nitroso, y kits disponibles en el mercado para introducir mutaciones. Una mutación puede producirse en la secuencia de bases usando estos métodos.

Las posiciones y tipos de mutaciones introducidas no están particularmente limitados. Los sitios de mutación de los clones representados por los clones n.º 1 a 17 se indican como ejemplos específicos en la tabla 2 a continuación. Sin embargo, las posiciones y tipos de mutaciones introducidas no están limitados a estos.

Tabla 2

Clon n.º	SEQ ID NO: (Tipo silvestre)	Posiciones de las bases	Antes de la mutación	Después de la mutación
1	1	79 a 81	TAC	TTC, TTT
	1	85 a 87	AAT	CTC, TTA, TTG, CTT, CTA, CTG
	1	130 a 132	AAC	AGC, TCT, TCC, TCA, TCG, AGT
	1	172 a 174	AAG	AGG, CTG, CGC, CGA, CGQ, AGA
2	2	88 a 90	ATC	GTC, GTT, GTA, GTG
3	2	97 a 99	AAT	GAT, GAC
4	2	106 a 108	GGG	AGG, CTG, CGA, CGC, CGQ, AGA
5	2	175 a 177	TCG	ACG, ACT, ACC, ACA
6	2	268 a 270	ACT	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
7	2	394 a 396	CAA	CGA, CTG, CGC, CGQ AGA, AGG
8	2	460 a 462	TTG	ATG
9	2	520 a 522	TCT	ACT, ACC, ACA, ACG
10	2	583 a 585	CCC	CAC, CAT

11	2	589 a 591	AGC	AAC, AAT
12	2	649 a 651	GGA	GAA, GAG
13	2	715 a 717	TAC	CAC, CAT
14	2	724 a 726	AGC	AGC, TCT, TCC, TCA, TCG, AGT
15	2	97 a 99	AAT	GAT, GAC
	2	106 a 108	GGG	AGG, CTG, CGC, CGA, CGQ, AGA
	2	268 a 270	ACT	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
	2	394 a 396	CAA	CGA, CTG, CGC, CGG, AGA, AGG
	2	460 a 462	TTG	ATG
	2	520 a 522	TCT	ACT, ACC, ACA, ACG
	2	583 a 585	CCC	CAC, CAT
	2	589 a 591	AGC	AAC, AAT
	2	649 a 651	GGA	GAA, GAG
16	2	88 a 90	ATC	GTC, GTT, GTA, GTG
	2	97 a 99	AAT	GAT, GAC
	2	106 a 108	GGG	AGG, CTG, CGA, CGC, CGQ, AGA
	2	460 a 462	TTG	ATG
17	2	88 a 90	ATC	GTC, GTT, GTA, GTG
	2	175 a 177	TCG	ACG, ACT, ACC, ACA
	2	460 a 462	TTG	ATG
	2	715 a 717	TAC	CAC, CAT
	2	724 a 726	AGC	AGC, TCT, TCC, TCA, TCG, AGT

[Vector de expresión]

El vector de expresión incluye un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante y no está particularmente limitado en otros aspectos. Desde el punto de vista de mejorar la eficacia de transformación a la eficacia de traducción, el vector de expresión es más preferiblemente un vector plasmídico o un vector de fago, cada uno de los cuales tiene una estructura como se analiza a continuación.

[Estructura básica del vector de expresión]

El vector de expresión incluye una secuencia de bases que codifica la xilanasa mutante y puede transformar la célula hospedadora, y el vector de expresión no está particularmente limitado en otros aspectos. Además de la secuencia de bases descrita anteriormente, el vector de expresión puede incluir además una secuencia de bases que constituye otra región (a partir de ahora en este documento mencionada simplemente como "otra región"), si fuera necesario.

Los ejemplos de la otra región incluyen una región de control necesaria para que el transformante produzca la xilanasa mutante y una región necesaria para la replicación autónoma.

Desde el punto de vista de facilitar la selección del transformante, el vector de expresión puede incluir además una secuencia de bases que codifica un gen para la selección que puede servir como marcador de selección.

Los ejemplos de la región de control necesaria para producir la xilanasa mutante incluyen una secuencia promotora (incluyendo una secuencia de operador que controla la transcripción), una secuencia de unión al ribosoma (secuencia SD) y una secuencia de terminador de la transcripción.

[Vector de expresión en el caso en que la célula hospedadora sea levadura]

En casos en que se usa levadura como célula hospedadora, el vector de expresión incluye preferiblemente una secuencia promotora además de la secuencia de bases que codifica la xilanasa mutante, desde el punto de vista de la eficacia de producción de la xilanasa mutante. La secuencia promotora puede ser cualquier secuencia que permita la expresión de la xilanasa mutante en un transformante del que la célula hospedadora es levadura.

Por ejemplo, se emplean secuencias promotoras tales como un promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), un promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK1), un promotor del factor de elongación de cadena peptídica (TEF), un promotor de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPD), un promotor de galactocinasa (GAL1), un promotor de metalotioneína (CUP1), un promotor de fosfatasa ácida reprimible (PHO5) y un promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Los orígenes de las secuencias promotoras no están limitados a la levadura, que sirve como célula hospedadora.

Pueden usarse promotores exógenos tales como un promotor de citomegalovirus (CMV). Estos promotores pueden

seleccionarse, según lo apropiado, de acuerdo con el origen y tipo de la enzima a usar.

El vector de expresión también puede incluir una señal de secreción. La inclusión de la señal de secreción permite que la xilanasa mutante se secreta al exterior de la célula cuando el transformante ha producido la xilanasa mutante.

La señal de secreción debe permitir que la xilanasa mutante se secrete desde la levadura que sirve como célula hospedadora, y no está particularmente limitada en otros aspectos. Desde el punto de vista de la eficacia de secreción, es preferible usar una secuencia señal de factor α, una secuencia señal de invertasa, una secuencia señal de fosfatasa ácida, una secuencia señal de glucoamilasa o similares.

Los ejemplos específicos de vectores de expresión que incluyen una secuencia promotora o una señal de secreción, tal como los descritos anteriormente, incluyen pRS423, pRS424, y YEplac195.

[Vector de expresión en el caso en el que la célula hospedadora es hongo filamentoso]

En casos en que se usa un hongo filamentoso como célula hospedadora, el vector de expresión incluye preferiblemente una secuencia promotora además de la secuencia de bases que codifica la xilanasa mutante, desde el punto de vista de la eficacia de producción de la xilanasa mutante. La secuencia promotora puede ser cualquier secuencia que permita la expresión de la xilanasa mutante en un transformante del que la célula hospedadora es un hongo filamentoso.

Los vectores de expresión adecuados para hongos filamentosos se describen en van den Hondel, C. A. M. J. J. et al., (1991) En: Bennett, J. W. y Easure, E. E. (eds.) More gene Manipulations in Fungi. Academic Press, pág. 396-428.

Además, también son útiles otros vectores de expresión usados habitualmente, tales como pUC18, pBR322, pUC100, pSE1180 (fabricado por Pharmacia, Inc.), pFB6, *Aspergillus* pRAX y *Trichoderma* pTEX.

[Vector de expresión en el caso en el que la célula hospedadora es procariota]

En casos en que la célula hospedadora es un procariota tal como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* o un actinomiceto, el vector de expresión incluye preferiblemente una secuencia promotora además de la secuencia de bases que codifica la xilanasa mutante, desde el punto de vista de la eficacia de producción de la xilanasa mutante. Además de la secuencia promotora, el vector de expresión puede incluir una secuencia de unión al ribosoma, una secuencia de terminador de la transcripción o similares.

Los ejemplos de la secuencia promotora incluyen un promotor del operón de triptófano (trp) y un promotor del operón de lactosa (lac), que se obtiene de *Escherichia coli*, un promotor PL y un promotor PR, que se obtiene del fago lambda, un promotor de la ácido glucónico sintetasa (gnt), un promotor de la proteasa alcalina (par), un promotor de la proteasa neutra (npr) y un promotor de la α-amilasa (amy), que se obtiene de *Bacillus subtilis*.

También son útiles secuencias promotoras modificadas o diseñadas independientemente, tales como un promotor tac.

La secuencia de unión al ribosoma puede ser una secuencia obtenida de *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*. La secuencia de unión al ribosoma debe funcionar en una célula hospedadora deseada, tal como en *Escherichia coli o Bacillus subtilis*, pero no está particularmente limitada en otros aspectos.

Los ejemplos de la secuencia de unión al ribosoma incluyen una secuencia consenso que consiste en cuatro o más bases consecutivas en una secuencia complementaria a la región del extremo 3' del ARN del ribosoma 16S y que se ha producido por síntesis de ADN.

La secuencia del terminador de la transcripción no es esencial. Pueden usarse secuencias del terminador de la transcripción que no son dependientes del factor ρ, tales como un terminador de lipoproteína y un terminador del operón trp.

El orden en que se disponen estas regiones de control en el vector de expresión no está particularmente limitado. Considerando la eficacia de la transcripción, es preferible que una secuencia promotora, una secuencia de unión al ribosoma, un gen que codifica una proteína diana y una secuencia del terminador de la transcripción se dispongan en este orden desde el extremo 5' en el lado 5'-terminal.

Respecto a los ejemplos específicos de vectores de expresión que se usan en este documento, pueden utilizarse pBR322, pUC18, Bluescript II SK(+), pKK223-3 y pSC101, que tienen una región que puede replicarse de forma autónoma en *Escherichia coli,* y pUB110, pTZ4, pC194, ρ11, ϕ1 y ϕ105, que tienen una región que puede replicarse de forma autónoma en *Bacillus subtilis*, como vectores de expresión.

Además, respecto a ejemplos de vectores de expresión que tienen capacidad de replicación autónoma en dos o más tipos de células hospedadoras, pueden usarse pHV14, TRp7, YEp7, pBS7 y similares como vectores de expresión.

[Método de producción del transformante]

El transformante de acuerdo con la invención puede producirse por métodos conocidos. Los ejemplos de los mismos incluyen un método que incluye construir un vector de expresión que incluye una secuencia de bases que codifica la xilanasa mutante de acuerdo con la invención y que opcionalmente incluye la otra región, y transformar una célula hospedadora deseada con el vector de expresión. Específicamente, pueden emplearse métodos generales conocidos en los campos de biología molecular, bioingeniería e ingeniería genética, tales como los descritos en Sambrook, J., et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, 3.ª Edición", Cold Spring Harbor Eaboratory Press, (2001).

El transformante de acuerdo con la invención puede producirse por, por ejemplo, incorporación de una mutación silenciosa de modo que un codón que tiene baja frecuencia de uso en la célula hospedadora se remplaza por un codón que tiene alta frecuencia de uso en la célula hospedadora, de acuerdo con las necesidades, además de incorporar el vector de expresión en la célula hospedadora.

Existe una posibilidad de que la cantidad de producción de la proteína derivada de la xilanasa mutante incorporada en el vector de expresión se aumente de este modo.

La tabla 3 a continuación ilustra un ejemplo de las maneras en que se introducen mutaciones silenciosas. Los métodos para la introducción de mutaciones silenciosas no están particularmente limitados con respecto a la técnica, los sitios de mutación, los tipos de bases a cambiar y similares, siempre que los métodos posibiliten la modificación de los codones del gen de xilanasa en el vector de expresión y los codones de la secuencia señal para causar la secreción del gen de la xilanasa al exterior de la célula, basándose en las frecuencias de uso de los codones en la célula hospedadora.

La tabla 3 a continuación indica las posiciones de las bases en que se añaden mutaciones silenciosas para permitir la expresión de la xilanasa mutante ACX02 a alta frecuencia en *T. viride*, y los tipos de las bases a cambiar.

En la tabla 3, las "posiciones de las bases" para la secuencia llamada "ACX02" indican las posiciones de las bases en la SEQ ID NO: 4. Las "posiciones de las bases" para la secuencia llamada "secuencia señal de *A. cellulolyticus*" indican las posiciones de las bases en la SEQ ID NO: 73.

Tabla 3

Nombre de la secuencia	Posiciones de las bases	Antes del cambio	Después del cambio
Secuencia señal de *A. cellulolyticus*	12	A	C
	42	G	T
	66	A	C
	90	G	C
ACX02	37	A	T
	38	G	C
	39	T	C
	78	T	A
	81	T	C
	106	A	C
	108	G	C
	138	A	C
	279	A	C
	312	A	C
	405	G	C
	474	A	C
	495	A	C
	552	T	C
	573	A	C
	648	G	A
	663	C	G
	718	A	T
	719	G	C
	720	T	C

[Método de cultivo del transformante]

Las condiciones para cultivar el transformante obtenido por transformación con el vector de expresión son como se

describe en la explicación de las condiciones para cultivar una célula hospedadora antes de la transformación, y pueden usarse condiciones conocidas.

Respecto al medio de cultivo, es útil tanto un medio sintetizado como un medio natural, con la condición de que el medio contenga una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, una sustancia inorgánica y otros nutrientes en cantidades apropiadas. Pueden emplearse componentes conocidos para los medios de cultivo. Por ejemplo, pueden usarse fuentes de nutrientes orgánicos tales como extracto de carne, extracto de levadura, extracto de malta, peptona, amina NZ y patatas, fuentes de carbono tales como glucosa, maltosa, sacarosa almidón y ácidos orgánicos, fuentes de nitrógeno tales como sulfato de amonio, urea y cloruro de amonio, fuentes de nutrientes inorgánicos tales como sales de fosfato, magnesio, potasio y hierro, y vitaminas, en combinaciones apropiadas.

En el cultivo de un transformante transformado con el vector de expresión que incluye un marcador de selección, por ejemplo, en casos en que el marcador de selección es un marcador de selección resistente a fármacos, se usa un medio que contiene un fármaco correspondiente al marcador de selección resistente a fármacos, mientras que en casos en que el marcador de selección es un marcador de selección auxotrófica, se usa un medio que no contiene un nutriente correspondiente al marcador de selección auxotrófica. El pH del medio puede seleccionarse dentro de un intervalo de pH 4 a pH 8.

El cultivo puede realizarse cultivando el transformante en un medio líquido que contiene el medio descrito anteriormente, usando un método de cultivo habitual tal como cultivo en agitación, cultivo de agitación con aireación, cultivo continuo o cultivo semicontinuo.

Las condiciones de cultivo pueden seleccionarse, según lo apropiado, de acuerdo con el tipo de transformante, el tipo de medio y el tipo de método de cultivo. Las condiciones de cultivo deben posibilitar que el transformante crezca y produzca la xilanasa mutante de acuerdo con la invención, y las condiciones de cultivo no están particularmente limitadas en otros aspectos.

La temperatura del cultivo es de 20 ºC a 45 ºC, y preferiblemente de 24 ºC a 37 ºC, y el cultivo se realiza de forma aerobia.

El periodo de cultivo puede establecerse a un periodo en el intervalo de 1 día a 7 días, y el cultivo puede continuarse hasta que el contenido de la proteína que tiene la actividad xilanasa mutante deseada alcance el máximo.

B. Proceso de recuperación de xilanasa mutante

El proceso de recuperación de la xilanasa mutante es un proceso de recuperación de la xilanasa mutante de al menos uno del transformante cultivado o un producto de cultivo del transformante.

El método para la recuperación de la xilanasa mutante de acuerdo con la invención después del cultivo del transformante obtenido por transformación puede ser un método habitualmente usado en la técnica.

En casos en que la xilanasa mutante de acuerdo con la invención se secreta al exterior del transformante obtenido por transformación, puede obtenerse fácilmente una solución de enzima cruda sometiendo el producto de cultivo del transformante a centrifugación, filtración o similares. En casos en que la xilanasa mutante de acuerdo con la invención se acumula en el transformante obtenido por transformación, puede recuperarse una solución de enzima cruda recuperando el transformante cultivado usando un medio tal como centrifugación, suspensión del transformante recuperado en una solución tamponante y descomposición de la membrana celular del transformante usando un método conocido tal como tratamiento con lisozima, congelación y descongelación o desintegración ultrasónica.

La solución de enzima cruda puede usarse como enzima concentrada que se concentra por un método de ultrafiltración o similar y se complementa con un conservante o similar. Puede obtenerse una enzima en polvo de la xilanasa mutante usando, por ejemplo, un método de secado por pulverización después de la concentración.

En casos en que la solución de enzima cruda recuperada que tiene una actividad xilanasa tenga que separarse y purificarse, por ejemplo, puede realizarse desalado usando superficie de amonio o similar, métodos de precipitación en disolvente orgánico usando alcohol o similares, métodos de separación con membrana usando diálisis, ultrafiltración o similares, y métodos conocidos de separación cromatográfica tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de alta velocidad de fase inversa, cromatografía de afinidad y cromatografía de filtración en gel, en combinaciones apropiadas.

(4) Uso de xilanasa mutante

Como se describe anteriormente, la xilanasa mutante de acuerdo con la invención tiene actividad estable durante un largo periodo de tiempo incluso en condiciones en que las enzimas se inactivan fácilmente. Por lo tanto, la xilanasa mutante de acuerdo con la invención puede usarse en una amplia gama de usos.

Una composición de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante descrita anteriormente y también puede incluir componentes seleccionados libremente adecuados para la aplicación deseada, si fuera necesario.

La composición de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante descrita anteriormente, que trabaja de forma estable durante un largo periodo de tiempo incluso en condiciones en que las enzimas se inactivan fácilmente. Por lo tanto, la composición de acuerdo con la invención puede usarse para diversos usos.

El contenido de la xilanasa mutante puede establecerse, según lo apropiado, de acuerdo con el uso de la composición, y no está particularmente limitado.

La xilanasa mutante de acuerdo con la invención puede usarse en diversos usos. La xilanasa mutante se utiliza preferiblemente de la manera descrita a continuación.

[Método de producción de sacárido a partir de materia prima lignocelulósica]

El método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa de acuerdo con la invención incluye poner en contacto la xilanasa mutante con una materia prima lignocelulósica.

En el método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa de acuerdo con la invención, se usa la xilanasa mutante descrita anteriormente, que puede trabajar de forma estable durante un largo periodo de tiempo incluso en una condición en que las enzimas se inactivan fácilmente; por lo tanto, la producción puede realizarse en condiciones en que las enzimas se inactivan fácilmente, y la sacarificación de lignocelulosa puede conseguirse de forma eficaz.

Las materias primas lignocelulósicas conocidas que tienen un bajo contenido de lignina pueden usarse como materia prima lignocelulósica.

La expresión "bajo contenido de lignina" se refiere a un contenido de lignina de menos de un 30 % en masa, considerando que el contenido promedio de lignina de las materias primas lignocelulósicas es de aproximadamente un 30 % en masa con respecto a la cantidad total de materia prima lignocelulósica. Las materias primas lignocelulósicas que tienen un contenido de lignina de un 20 % en masa o inferior son preferibles, y las materias primas lignocelulósicas que tienen un contenido de lignina de un 10 % en masa o inferior son más preferibles.

Los ejemplos de la materia prima lignocelulósica incluyen fibras de pasta que incluyen celulosa y hemicelulosa como componentes principales, y que se obtienen por eliminación de alto grado de lignina de materias lignocelulósicas tales como madera blanda, madera dura, un residuo de la tala, residuo de madera de la construcción, residuos de poda, serrín, kenaf, y residuos agrícolas tales como paja de arroz y paja de trigo usando un método de producción de pasta química, tal como extracción en álcali o digestión alcalina o usando un método tal como Organosolv. Los ejemplos preferibles de la misma incluyen pasta kraft de madera dura, pasta kraft de madera blanda, pasta mecánica, pasta derivada de una planta herbácea tal como kenaf, papel residual o lodo de papel (incluyendo contenido de fibra de pasta recuperado de una fábrica de pasta de papel) o cualquier mezcla de los mismos. En particular, la pasta kraft de madera dura y la pasta kraft de madera blanda son más preferibles.

Cada una de estas materias primas lignocelulósicas está disponible en empresas de fabricación general de pasta.

Los ejemplos de métodos para poner en contacto la xilanasa mutante con una materia prima lignocelulósica incluyen: un método que incluye añadir la xilanasa mutante a la materia prima lignocelulósica y permitir que continúe la reacción mientras se agita; un método que incluye permitir que la reacción continúe mientras se agita; y un método que incluye mezclar suficientemente la xilanasa mutante y la lignocelulosa y después permitir que la mezcla repose para permitir que continúe la reacción. Desde el punto de vista de la eficacia de la reacción, un método preferible es un método que incluye añadir la xilanasa mutante a la materia prima lignocelulósica y permitir que la reacción continúe mientras se agita.

Los recipientes de reacción útiles para la reacción no están particularmente limitados. El recipiente de reacción es preferiblemente un recipiente de reacción que puede agitarse para mezclar suficientemente la materia prima lignocelulósica y la xilanasa mutante que se ha añadido a la misma, y que tiene una función de control de la temperatura con la que puede mantenerse la temperatura a la temperatura óptima de la xilanasa mutante.

La temperatura de reacción puede ser cualquier temperatura a la que pueda trabajar la xilanasa mutante, sin restricciones particulares. Por ejemplo, la temperatura de reacción puede ser de 40 °C a 60 °C, y preferiblemente de 40 °C a 55 °C.

El pH de la solución en el recipiente de reacción de sacarificación puede ser cualquier pH a que pueda trabajar la xilanasa mutante, sin restricciones particulares. Por ejemplo, el pH puede ser de pH 4 a pH 7, y preferiblemente de pH 4 a pH 6.

En el método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa de acuerdo con la invención, además de la xilanasa mutante de acuerdo con la invención, pueden usarse otras enzimas en combinación con la xilanasa mutante, si fuera necesario.

Respecto a las otras enzimas, pueden usarse enzimas, por ejemplo, celulasa, xilosidasa, mananasa, pectinasa, galactosidasa, glucuronidasa y arabinofuranosidasa en combinación con la xilanasa mutante. Desde el punto de vista de producción eficaz de un producto sacarificado de lignocelulosa, la celulasa se usa preferiblemente en combinación con la xilanasa mutante.

Pueden usarse celulasas conocidas que descomponen la celulosa en glucosa como la celulasa, sin restricciones. Los ejemplos de celulasa incluyen celulasas que tienen al menos una actividad seleccionada de una actividad endoglucanasa, una actividad celobiohidrolasa o una actividad β-glucosidasa. Además, desde el punto de vista de actividad enzimática, la celulasa es preferiblemente una mezcla de enzimas que tiene estas actividades.

El origen de la celulasa no está limitado, y pueden usarse celulasas de hongos filamentosos, basidiomicetos, bacterias y similares. Por ejemplo, es posible usar una, o una mezcla de dos o más, seleccionadas del grupo que consiste en: celulasas derivadas de diversas fuentes tales como hongos filamentosos del género *Trichoderma*, el género *Acremonium*, el género *Aspergillus* o similares, basidiomicetos del género *Irpex* o similares, bacterias del género *Aeromonas*, el género *Clostridium*, el género *Bacillus*, el género *Pseudomonas*, el género *Penicillium*, el género *Humicola*, o similares; y celulasas producidas por recombinación genética usando celulasas derivadas de estas fuentes como moldes. También es posible usar directamente una formulación de celulasa disponible en el mercado general, un producto cultivado de cualquiera de los microorganismos mencionados anteriormente o un filtrado obtenido del producto cultivado.

Entre estas, la celulasa derivada del género *Trichoderma* o la celulasa derivada del género *Acremonium* es preferible considerando su fuerte potencia de descomposición de la celulosa.

Los ejemplos de celulasas disponibles en el mercado que pueden usarse incluyen ACCELLERASE 1000 (fabricado por Genencor Co., Ltd.), ACCELLERASE 1500 (fabricado por Genencor), ACCELLERASE XC (fabricado por Genencor), ACCELLERASE XY (fabricado por Genencor), ACCELLERASE DUET (fabricado por Genencor), ACCELLERASE TRIO (fabricado por Genencor), CELLUCLAST (fabricado por Novozymes), CELLIC CTEC (fabricado por Novozymes), CELLIC HTEC (fabricado por Novozymes), CELLIC CTEC2 (fabricado por Novozymes), CELLIC HTEC2 (fabricado por Novozymes), ACREMONIUM CELLULASE (fabricado por Meiji Seika Pharma Co., Ltd.), MEICELLASE (fabricado por Meiji Seika Pharma Co., Ltd.), CELLULASE AMANO A (fabricado por Amano Enzyme Co., Ltd.), CELLULASE AMANO T (fabricado por Amano Enzyme Co., Ltd.), CELLULASE DAIWA (fabricado por Daiwa Fine Chemicals Co., Ltd.), CELLULIZER (fabricado por Nagase Biochemicals Ltd.), DRISELASE (fabricado por Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), CELLULASE ONOZUKA (fabricado por Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd.) y CELLULOSIN (fabricado por Hankyu Bioindustry Co., Ltd.).

La relación de mezcla de la xilanasa mutante a la celulasa puede ser cualquier relación de mezcla a la que se maximice la cantidad de producción de azúcar reductor. Preferiblemente, la xilanasa mutante se mezcla en una relación de un 20 % a un 60 % con respecto a la celulasa.

La concentración de materia prima lignocelulósica como sustrato a añadirse en el recipiente de reacción y la concentración total de enzimas incluyendo la xilanasa mutante y las otras enzimas (a partir de ahora mencionado como simplemente "enzimas") no están particularmente limitadas.

Para operaciones tales como transferencia, carga y similares de la materia prima lignocelulósica, es preferible una concentración de contenido de sólidos de un 8 % a un 30 % en masa.

Las enzimas a usarse pueden añadirse en una cantidad suficiente para la descomposición eficaz del sustrato en vista de la actividad de las enzimas. La cantidad de las enzimas puede ajustarse, según lo apropiado, de acuerdo con, por ejemplo, los tipos de las enzimas.

El producto sacarificado producido por el método de producción de un producto sacarificado a partir de una materia prima lignocelulósica de acuerdo con la invención y el método de producción de un producto sacarificado a partir de una materia prima lignocelulósica que implica la reutilización de enzimas de sacarificación de acuerdo con la invención puede ser cualquier producto sacarificado derivado de lignocelulosa. Los ejemplos específicos del producto sacarificado incluyen monosacáridos y oligosacáridos, que consisten en dos o más unidades de azúcar. Los ejemplos de los monosacáridos incluyen glucosa, xilosa, arabinosa, fructosa, manosa y galactosa.

El producto sacarificado puede usarse para producir agentes químicos, combustibles, plásticos y otros productos o intermedios. El producto sacarificado también puede usarse como materia prima para la fermentación para producir estas sustancias usando microorganismos.

Los ejemplos de los agentes químicos, combustibles, plásticos y otros productos incluyen etanol, isopropanol,

acetona, acetato, 1,3-propanodiol, butanodiol, glicerol, etilenglicol, aminoácidos, ácidos orgánicos, furfural, polihidroxialcanoatos, piensos para animales y xilosa.

En particular, el producto sacarificado es muy adecuado para su uso en la producción por fermentación de etanol, isopropanol, ácido láctico o similares.

[Método de producción de xilanasa mutante para reutilización]

El método de producción de una xilanasa mutante para reutilización de acuerdo con la invención incluye recuperar la xilanasa mutante de acuerdo con la invención de una solución de reacción de sacarificación que contiene un producto sacarificado de lignocelulosa obtenido por el método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa; este proceso se menciona a partir de ahora en este documento también como "proceso de recuperación" y la solución de reacción de sacarificación mencionada anteriormente se menciona a partir de ahora en este documento también como simplemente la "solución de reacción de sacarificación".

De acuerdo con este método, la xilanasa mutante de acuerdo con la invención puede producirse a bajo coste.

En el proceso de recuperación, el método de recuperación a usar puede ser un método conocido. Los ejemplos del mismo incluyen un método que incluye realizar separación de sólido-líquido y recuperar la enzima usando un dispositivo de membrana u otro dispositivo conocido que pueda recuperar la enzima.

Los ejemplos de métodos para la separación de sólido-líquido incluyen centrifugación y filtración gruesa de la solución de reacción de sacarificación.

Con respecto a las condiciones para la centrifugación o filtración gruesa, los métodos habitualmente empleados en la técnica pueden usarse tal cual. Por ejemplo, en el caso de centrifugación, puede realizarse a 500xg hasta 10 000xg.

En el caso de filtración gruesa, la filtración puede realizarse usando un filtro de acero inoxidable, un filtro cerámico o una membrana de filtro de resina, cada uno de los cuales tiene un tamaño de abertura de 0,1 µm a 2 mm.

Puede realizarse microfiltración usando una membrana de microfiltración. En este caso, se usan preferiblemente membranas de microfiltración que tienen un tamaño de poro promedio de 0,01 µm a 10 µm.

Los ejemplos de métodos para microfiltración usando una membrana de microfiltración incluyen filtración a presión, filtración a vacío, filtración de flujo cruzado y filtración por centrifugación. Entre ellas, la filtración de flujo cruzado posibilita la reducción de la obstrucción de la membrana.

En el caso de recuperar enzimas de una solución después de separación de sólido-líquido, los ejemplos de métodos, por lo tanto, incluyen un método en que se usa una columna de resina y un método en que se usa un dispositivo de membrana.

Los ejemplos del método en que se usa una columna de resina incluyen métodos conocidos de separación cromatográfica tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de alta velocidad de fase inversa, cromatografía de afinidad y cromatografía de filtración en gel.

Respecto al dispositivo de membrana, la recuperación puede realizarse usando, por ejemplo, un dispositivo de membrana que tiene una membrana de ultrafiltración, una membrana de diálisis o similares. Entre ellas, es más preferible el uso de una membrana de ultrafiltración que tiene un tamaño de poro promedio de 0,001 µm a 0,01 µm.

Hay membranas de ultrafiltración de, por ejemplo, tipo de membrana plana, tipo de membrana plana de múltiples fases y tipo de fibra hueca. La ultrafiltración descrita anteriormente puede ser cualquiera de estos tipos. En el caso del tipo de membrana plana, puede conseguirse una velocidad de filtración apropiada aplicando una presión al interior del tanque de reacción. Preferiblemente se emplea gas nitrógeno, gas helio, aire o similares para la aplicación de una presión. Es preferible instalar un propulsor en el tanque de reacción de acuerdo con las necesidades. La agitación del líquido usando un propulsor evita la obstrucción en la superficie de la membrana y posibilita el mantenimiento de una velocidad de filtración más favorable. En los casos del tipo de membrana plana de múltiples fases y el tipo de fibra hueca, el líquido puede suministrarse desde un tanque de suministro de sustrato al tanque de reacción usando una bomba, por la que se mantiene una presión de filtración apropiada y una velocidad lineal apropiada, y puede mantenerse una velocidad de filtración más favorable.

Los ejemplos de métodos de filtración incluyen un método de membrana sumergida, un método de ultrafiltración y un método de microfiltración. La filtración por presión, la filtración por vacío, la filtración de flujo cruzado, la filtración por centrifugación y similares son útiles tanto en el método de ultrafiltración como en el método de microfiltración. Las operaciones de filtración se clasifican aproximadamente en filtración a presión constante, filtración de flujo constante y filtración con una presión no constante y un flujo no constante; no hay limitaciones particulares a las operaciones

de filtración en la invención.

Los ejemplos del material de la membrana usada en el proceso de recuperación en la invención incluyen acetato de celulosa, poliamida aromática, poli(alcohol vinílico), polisulfona, poli(fluoruro de vinilideno), polietileno, poliacrilonitrilo, cerámica, polipropileno, policarbonato y politetrafluoroetileno (TEFLON (marca registrada)). Entre estos materiales, es más preferible usar una membrana hecha de un material no celulósico resistente a ácido, tal como poliacrilonitrilo o polisulfona, considerando el uso de una celulosa y una reacción en condiciones ácidas.

La solución de reacción de sacarificación inmediatamente después de la producción de la misma puede usarse como la solución de reacción de sacarificación para su uso en el proceso de recuperación, sin ningún pretratamiento tal como la separación de sólido-líquido.

Una xilanasa mutante para reutilización producida por el método de producción de una xilanasa mutante para reutilización de acuerdo con la invención puede usarse en diversos usos, como en el caso de la xilanasa mutante de acuerdo con la invención descrita anteriormente. La xilanasa mutante para reutilización también es útil para el método de producción de un monosacárido descrito a continuación.

[Método de producción de monosacárido]

Un método de producción de un monosacárido de acuerdo con la invención incluye:

recuperar la xilanasa mutante de acuerdo con la invención de una solución de reacción de sacarificación que contiene un producto sacarificado de lignocelulosa obtenido por el método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa descrito anteriormente (la recuperación de la xilanasa mutante se menciona a partir de ahora en este documento también como "el proceso de recuperación" y la solución de reacción de sacarificación mencionada anteriormente se menciona a partir de ahora en este documento también como simplemente la "solución de reacción de sacarificación"); y
producir un monosacárido poniendo en contacto la xilanasa mutante recuperada con una materia prima lignocelulósica (a partir de ahora en este documento mencionado simplemente como el "proceso de resacarificación").

De esta manera, la xilanasa mutante de acuerdo con la invención puede utilizarse de forma eficaz.

Para este proceso de recuperación, se aplica el proceso de recuperación descrito anteriormente.

En el proceso de resacarificación, la materia prima lignocelulósica y el agua se añaden a la solución enzimática que contiene la xilanasa mutante recuperada, y se realiza una reacción de resacarificación con agitación mientras se controla el pH y la temperatura. Las condiciones de pH y temperatura de la reacción pueden ser las mismas que las descritas en la explicación del método de producción de un producto sacarificado a partir de una materia prima lignocelulósica.

En el proceso de resacarificación, además de la materia prima lignocelulósica y el agua a suministrar adicionalmente, se añade preferiblemente un sólido obtenido por la separación de sólido-líquido en el proceso de recuperación. Esto hace posible utilizar de forma eficaz la lignocelulosa que no ha reaccionado contenida en el sólido como resultado de la separación de sólido-líquido usando un dispositivo de membrana o una columna de resina, y la xilanasa mutante que se absorbe en la lignocelulosa que no ha reaccionado.

En el proceso de resacarificación de acuerdo con la invención, la xilanasa mutante o el producto sólido obtenido como resultado de la separación de sólido, o ambos pueden suministrase adicionalmente.

En el método de producción de un monosacárido de acuerdo con la invención, el proceso de recuperación y el proceso de resacarificación pueden realizarse repetidamente. Esto hace posible reducir el coste del catalizador durante un periodo de tiempo durante el que se mantiene la actividad de la xilanasa mutante recuperada.

En el método de producción de un monosacárido de acuerdo con la invención, en casos en que se repite el proceso de recuperación y el proceso de resacarificación, la xilanasa mutante de acuerdo con la invención puede añadirse de forma reciente para el proceso de resacarificación. La cantidad de la xilanasa mutante a añadir de forma reciente no está particularmente limitada y es preferiblemente de no más de un 50 % en masa de la cantidad de la xilanasa mutante usada en la reacción de sacarificación inicial, desde el punto de vista económico. La cantidad de la xilanasa mutante a añadir de forma reciente es más preferiblemente de no más de un 20 % en masa de la cantidad de la xilanasa mutante usada en la reacción de sacarificación inicial desde el punto de vista económico, y la cantidad de la xilanasa mutante a añadir de forma reciente es aún más preferiblemente de no más de un 10 % en masa de la cantidad de la xilanasa mutante usada en la reacción de sacarificación inicial.

El monosacárido producido por el método de producción de un monosacárido de acuerdo con la invención puede ser cualquier monosacárido derivado de lignocelulosa. Los ejemplos específicos del mismo incluyen glucosa, xilosa,

arabinosa, fructosa, manosa y galactosa.

[Método de blanqueo de pasta]

Un método de blanqueo de una pasta de acuerdo con la invención incluye poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta.

En el método de blanqueo de una pasta de acuerdo con la invención, se usa la xilanasa mutante descrita anteriormente, que trabaja de forma estable durante un largo periodo de tiempo incluso en condiciones en que la enzima se inactiva fácilmente y, por lo tanto, el blanqueo puede realizarse usando condiciones en que las enzimas generalmente se inactivan fácilmente y la pasta puede blanquearse con alta eficacia.

La pasta usada en el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta puede ser una pasta de madera o una pasta que no es de madera. Los ejemplos de la pasta de madera incluyen aquellas hechas de materias primas de madera blanda o madera dura. Los ejemplos de la pasta que no es de madera incluyen aquellas hechas de materias primas tales como bagazo, que es una basura de caña de azúcar que queda después de exprimir, paja, cáñamo y algodón. Ejemplos adicionales de la pasta que no es de madera incluyen pasta de papel residual hecha de papel residual, tal como periódicos o revistas.

Estas pastas se clasifican aproximadamente en pastas mecánicas obtenidas por extracción de fibras de una materia prima usando una fuerza física y pastas químicas obtenidas por extracción de fibras por tratamiento químico. Los ejemplos de pastas mecánicas incluyen pasta molida, pasta de molienda de refinería, pasta termomecánica y pasta quimiotermomecánica. Los ejemplos de pastas químicas incluyen pasta Kraft, pasta alcalina y pasta de sulfito.

En proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta, además de la xilanasa mutantes, puede usarse adicionalmente otra hemicelulasa o ligninasa. Esto eleva el grado de blanqueo de la pasta.

Los orígenes de la hemicelulasa y la ligninasa no están particularmente limitados, y los ejemplos de los orígenes incluyen hongos filamentosos, basidiomicetos y bacterias.

El método de blanqueo de una pasta de acuerdo con la invención incluye preferiblemente además un proceso de tratamiento de deslignificación y proceso de blanqueo, además del proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta.

En la presente memoria descriptiva, el proceso de tratamiento de deslignificación puede ser cualquier método objetivo de eliminar positivamente la lignina de una pasta, y pueden usarse métodos que se han puesto en práctica desde el pasado. Los ejemplos de los mismos incluyen un método descrito en el documento JP-A N.º 2004-263310.

En la presente memoria descriptiva, el proceso de blanqueo puede ser cualquier proceso que realice un tratamiento de blanqueo en la pasta, y el alcance del mismo generalmente abarca un proceso con el objetivo de, por ejemplo, eliminar la lignina que permanece en la pasta o mejorar la blancura de la pasta. El proceso de blanqueo es un proceso que sigue el proceso de tratamiento de deslignificación, y pueden usarse métodos que se han puesto en práctica desde el pasado. Los ejemplos de los mismos incluyen un método descrito en el documento JP-A N.º 2010-1594.

En casos en que el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante de acuerdo con la invención con una pasta se realice en combinación con el proceso de tratamiento de deslignificación y el proceso de blanqueo, el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta puede realizarse en cualquier punto en el tiempo durante los procesos desde el proceso de tratamiento de deslignificación hasta el proceso de blanqueo. Específicamente, el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta puede realizarse antes o después del proceso de tratamiento de deslignificación, o antes o después del proceso de blanqueo. Como alternativa, el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta puede realizarse simultáneamente con el proceso de tratamiento de deslignificación o el proceso de blanqueo.

Preferiblemente, el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante de acuerdo con la invención con una pasta se realiza como parte del proceso de blanqueo. En particular, desde el punto de vista de posibilitar que la capacidad de la xilanasa mutante de acuerdo con la invención se ejerza de forma máxima, el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta se realiza más preferiblemente en una fase del proceso de blanqueo en que el contenido de lignina es pequeño.

Como alternativa, el proceso de poner en contacto la xilanasa mutante con una pasta también puede usarse, por ejemplo, como parte del proceso de blanqueo en que, entre los procesos de blanqueo descritos anteriormente, se realiza blanqueo químico usando cloro, dióxido de cloro, dióxido de nitrógeno, un hipoclorito, oxígeno, peróxido de hidrógeno, ozono o similares.

[Detergente]

Un detergente de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante descrita anteriormente, y puede incluir además otros componentes, según lo necesario.

El detergente de acuerdo con la invención tiene rendimiento mejorado debido a la inclusión de la xilanasa mutante, que muestra actividad estable incluso en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente.

El alcance del detergente de acuerdo con la invención abarca diversos detergentes tales como detergentes de lavandería y detergentes para lavavajillas. El detergente de acuerdo con la invención puede usarse como detergente para uso en el hogar y uso industrial. El detergente de acuerdo con la invención también es útil como modificador para productos de fibras para textiles.

Cuando el detergente de acuerdo con la invención se usa como modificador para un producto de fibras para textiles, el producto de fibras para textiles al que se aplica el detergente puede ser, por ejemplo, fibras de algodón, fibras de cáñamo o fibras que contienen celulosa tales como rayón o tencel.

El detergente de acuerdo con la invención puede incluir además otras enzimas además de la xilanasa mutante, de acuerdo con los usos. Pueden usarse enzimas conocidas en la técnica como las otras enzimas. Los ejemplos de las mismas incluyen proteasa, celulasa, amilasa y lipasa. Los orígenes de las otras enzimas no están limitados, y los ejemplos de los mismos incluyen hongos filamentosos, basidiomicetos y bacterias.

El detergente de acuerdo con la invención también puede incluir componentes, diferentes de las otras enzimas mencionadas anteriormente, que habitualmente se usan en detergentes, cuyos ejemplos incluyen tensioactivos, auxiliares de limpieza, auxiliares de blanqueo y agentes fluorescentes.

Los ejemplos del tensioactivo incluyen tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos anfóteros y tensioactivos catiónicos. Los tensioactivos aniónicos y los tensioactivos no iónicos son preferibles.

Los ejemplos de los tensioactivos aniónicos incluyen sales de sodio de ácidos grasos (jabón), éster de ácido graso α-sulfonatado de sodio, sulfonato de alquil benceno lineal de sodio (LAS), alquil sulfato de sodio (AS), alquil éter sulfato de sodio (AES), sulfonato de α-olefina de sodio (AOS) y alquil sulfonato de sodio.

Los ejemplos de los tensioactivos no iónicos incluyen éter alquílico de polioxialquileno (AE), éter alquil fenílico de polioxietileno (APE), ésteres de sal de ácido graso de sacarosa, ésteres de ácido graso de sorbitán, ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitán, ésteres de ácido graso de polioxietileno y alcanolamidas.

Los ejemplos de los auxiliares de limpieza incluyen tampones de álcali, aceptores de iones metálicos divalentes y agentes antirresedimentación. Los ejemplos específicos de los mismos incluyen polifosfatos tales como tripolifosfato y pirofosfato, aluminosilicatos tales como zeolita de tipo-A, carbonatos tales como carbonato de sodio, sesquicarbonato de sodio e hidrogenocarbonato de sodio, polímeros tales como polietilenglicol, polímeros basados en ácido carboxílico, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y sales de poli(ácido glicidílico), derivados de celulosa tales como carboximetilcelulosa y polímeros basados en ácido aminocarboxílico tales como poli(ácido aspártico).

Los ejemplos de los agentes de blanqueo incluyen hipoclorito de sodio, dicloroisocianuratos, clorito de sodio, peróxido de hidrógeno, percarbonato de sodio, perborato de sodio, ácido peracético, hidrosulfito y dióxido de ácido tioúrico.

Los ejemplos de los agentes fluorescentes incluyen derivados de ácido bis-(triazinilamino)estilbeno disulfónico y derivados de bis-estiril bifenilo.

El detergente de acuerdo con la invención puede combinarse con el tensioactivo, el auxiliar de limpieza, el agente de blanqueo, el agente fluorescente o similares, y producirse de acuerdo con métodos habituales.

La forma del detergente puede seleccionarse de acuerdo con los usos, y puede ser, por ejemplo, líquido, polvo, gránulos, pasta o sólido.

[Pienso para animales]

Un pienso para animales de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante descrita anteriormente y puede incluir además otros componentes, según lo necesario.

El pienso para animales de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante que muestra actividad estable incluso en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente. Como resultado, la eficacia de absorción de los nutrientes vegetales en los animales que se han comido el pienso para animales de acuerdo con la invención se mejora, y también se mejora la digestibilidad del mismo en el estómago de los animales, debido a la descomposición de las fibras vegetales abundantes en el pienso para animales.

El contenido de la xilanasa mutante en el pienso para animales de acuerdo con la invención debe ser una cantidad que pueda mejorar la digestibilidad del pienso para animales en el estómago de los animales, pero el contenido no está particularmente limitado en otros aspectos.

Los ejemplos del pienso para animales incluyen piensos para animales preparados que contienen xilano y granos. Entre los granos, son particularmente preferibles el trigo, maíz, centeno, cebada, avena, triticale, arroz y sorgo.

La xilanasa mutante en el pienso para animales de acuerdo con la invención puede usarse en combinación con otros aditivos para piensos y/u otras enzimas.

Los ejemplos de otros aditivos para piensos incluyen aditivos vitamínicos para piensos, aditivos minerales para piensos, aditivos aminoacídicos para piensos y agentes protectores permeables.

Los ejemplos de otras enzimas incluyen celulasa, amilasa y proteasa. Los orígenes de estas enzimas no están limitados y pueden usarse enzimas derivadas de hongos filamentosos, basidiomicetos, bacterias o similares.

El pienso para animales de acuerdo con la invención es útil para una amplia gama de animales. Los ejemplos preferibles de los animales incluyen aves de corral tales como pollos, pavos, patos y gansos, rumiantes tales como vacas, caballos y ovejas, verracos y puercos tales como cerdos, roedores tales como conejos, y peces.

El pienso para animales de acuerdo con la invención puede producirse por cualquier método, siempre que el pienso para animales incluye la xilanasa mutante, y el método para producir el pienso para animales no está particularmente limitado. La adición de la xilanasa mutante en el pienso para animales puede realizarse en cualquier fase seleccionada desde antes de la producción del pienso para animales, durante la producción del pienso para animales o en la fase final de la producción del pienso para animales. La xilanasa mutante puede añadirse directamente al pienso para animales preparado que se ha formado en una forma de gránulo o una forma de puré. Como alternativa, la xilanasa mutante puede incorporarse en el pienso para animales añadiéndose directamente al agua de beber.

[Modificador de la fabricación del pan]

Un modificador para la fabricación del pan de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante descrita anteriormente y puede incluir además otros componentes, según lo necesario.

El modificador para la fabricación del pan de acuerdo con la invención incluye la xilanasa mutante descrita anteriormente, que muestra actividad estable incluso en condiciones intensas en que las enzimas se inactivan fácilmente. Debido a la inclusión de la xilanasa mutante, el modificador para la fabricación del pan de acuerdo con la invención muestra actividad estable incluso durante el proceso de fermentación en la fabricación del pan, que se realiza de 35 ºC a 40 ºC durante 1 horas hasta 2 horas, mediante lo que la hemicelulosa contenida en la harina puede descomponerse y puede modificarse la calidad de la fabricación del pan.

El modificador de la fabricación de acuerdo con la invención puede incluir otros modificadores para la fabricación del pan, además de la xilanasa mutante. Los ejemplos de los otros modificadores para la fabricación del pan incluyen monoglicéridos, monoglicéridos de ácido orgánico, ésteres de ácido graso de glicerina, ésteres de ácido graso de propilenglicol, ésteres de ácido graso de sorbitán, fosfolípidos, ácidos ascórbicos y derivados de los mismos, ácidos orgánicos, aminoácidos y sales.

Respecto al tipo de pan al que tiene que añadirse el modificador para la fabricación del pan de acuerdo con la invención, el pan puede ser cualquier pan que se produzca mezclando ingredientes para el pan y realizando además el amasado, la fermentación, el horneado y similares. Los ejemplos de los mismos incluyen, además de pan blanco, pan especial, pan relleno, bollería, pan al vapor, panqueques y rosquillas.

Los ejemplos de ingredientes para estos panes incluyen harina, contenidos de agua tales como productos acuosos y lácteos, levaduras, azúcares, sal común y aceites y grasas (tales como manteca, tocino, margarina, mantequilla y aceite líquido). Si fuera necesario, también pueden añadirse huevos, aderezos (tales como ácidos glutámicos y ácidos nucleicos), levadura química, aromas y similares. En casos en que la harina es una materia prima principal, también puede usarse harina de centeno, harina de arroz o similares en combinación con la harina. En la presente memoria descriptiva, el término "masa" significa un material obtenido por mezcla y amasado de los ingredientes del pan mencionados anteriormente.

Los métodos para producir pan pueden ser métodos empleados habitualmente que incluyen un proceso de fermentación, sin limitaciones particulares. Por ejemplo, puede usarse un método de masa directa, un método de esponja y masa, y un método de prefermentado y masa.

Para el proceso de fermentación, pueden usarse métodos empleados habitualmente. El proceso de fermentación se realiza preferiblemente de 35 ºC a 40 ºC durante 1 hora a 2 horas ya que el tiempo de fermentación puede acortarse

estableciendo la temperatura de fermentación relativamente elevada en comparación con la temperatura ambiente.

El modificador para la fabricación del pan de acuerdo con la invención puede mezclarse, por ejemplo, como un polvo con una materia prima tal como harina, o disolverse en agua antes de su uso, o añadirse como polvo o líquido en una determinada fase en el proceso.

Aunque se describen anteriormente realizaciones de la invención, estas realizaciones son simplemente ejemplos de la invención, y también pueden emplearse diversas configuraciones, diferentes de las descritas anteriormente.

Ejemplos

La invención se describirá en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, la invención no está limitada de ninguna manera a los siguientes ejemplos. Los porcentajes que indican las cantidades de componentes incluidas en las composiciones en los ejemplos son porcentajes en masa, salvo que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1: Método para medir la actividad xilanasa (ensayo convencional)

Se midió la cantidad de azúcares reductores liberados por la hidrólisis de xilano por el método DNS (Bailey et al., 1992), para determinar la actividad xilanasa.

El sustrato usado para la evaluación fue un sobrenadante preparado por mezcla vigorosa conjuntamente de una solución de tampón citrato de sodio 100 mM (pH 4,5) con xilano de abedul al 1 % (p/p) (fabricado por Sigma-Aldrich Corporation) y después por centrifugación a 5000 xg durante 15 minutos.

La xilanasa se mezcló con esta solución de sustrato de modo que la cantidad de xilanasa fuera de un 0,1 % (p/p) de la de la solución de sustrato, y se dejó que continuara la reacción con agitación a 45 ºC durante 30 minutos. La cantidad de azúcares reductores en la solución de reacción resultante se midió para determinar la actividad xilanasa.

Ejemplo 2: Producción de xilanasa mutante por mutagénesis dirigida al sitio y evaluación de la misma

(1) Construcción de vectores de expresión: YEp-GAPDHp-GAs-TVX y YEp-GAPDHp-GAs-ACX

(a) Obtención de la secuencia promotora

Usando una secuencia de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* como molde, se obtuvo una secuencia promotora (número de acceso a GenBank: A35397.1) de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (a partir de ahora en este documento mencionada como "GAPDH") por PCR. Las secuencias cebadoras usadas en la PCR se presentan como las SEQ ID NO. 55 y 56 en la tabla 4 a continuación.

(b) Obtención de la secuencia señal

Usando la secuencia de ADN genómico de *Rhizopus oryzae* como molde, se obtuvo una secuencia señal de un gen de glucoamilasa (número de acceso a GenBank: D00049.1) por PCR. Las secuencias cebadoras usadas en la PCR se presentan como las SEQ ID NO: 57 y 58 en la tabla 4 a continuación.

(c) Ligamiento de la secuencia promotora y la secuencia señal

Las secuencias de ADN amplificadas por la PCR se purificaron usando una solución de fenol/cloroformo y se recuperaron a través de precipitación en etanol. La secuencia promotora y la secuencia señal purificadas se digirieron con un enzima de restricción BglII, y después de ello se sometieron individualmente a electroforesis en agarosa, y se separaron y purificaron los fragmentos que incluían los ADN deseados. Los fragmentos así obtenidos se ligaron usando una ADN ligasa (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.). El producto ligado se abrevia a partir de ahora en este documento como "GAPDHp-GAs".

(d) Amplificación del gen de xilanasa II derivado de *T. viride*

Usando una secuencia de ADN genómico de *T. viride* como molde, se obtuvo la longitud completa de un gen de xilanasa II derivado de *T. viride* (una secuencia de bases que codifica el gen de la xilanasa, así como una secuencia señal de secreción) por PCR. Las secuencias cebadoras usadas en la PCR se presentan como la SEQ ID NO: 59 y la SEQ ID NO: 60 en la tabla 4 a continuación. La secuencia obtenida se presenta como la SEQ ID NO: 74 en el listado de secuencias.

(e) Amplificación de gen de xilanasa derivado de *A. cellulolyticus*

Usando una secuencia de ADN genómico de *A. cellulolyticus* como molde, se obtuvo la longitud completa de un gen

de xilanasa derivado de *A. cellulolyticus* (una secuencia de bases que codifica el gen de la xilanasa, así como la secuencia señal de secreción) por PCR. Las secuencias cebadoras usadas en el PCR se presentan como las SEQ ID NO: 61 y 62 en la tabla 4 a continuación. La secuencia obtenida se presenta como la SEQ ID NO: 75 en el listado de secuencias.

(f) Ligamiento de la secuencia promotora, la secuencia señal y el gen de xilanasa

Usando la xilanasa II derivada de *T. viride* obtenida en (d) como molde, se obtuvo la secuencia de bases que codifica el gen de la xilanasa, excluyendo la secuencia señal, por PCR. Los cebadores usados en la PCR se presentan como la SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 64 en la tabla 4 a continuación. Después de ello, el fragmento obtenido se purificó y digirió con una enzima de restricción SacI, y después se ligó al fragmento GAPDHp-Gas. El producto de ligamiento se abrevia a partir de ahora en este documento como "GAPDHp-GAs-TVX".

Similar a lo anterior, también con respecto a la xilanasa I derivada de *A. cellulolyticus* obtenida en (e), se obtuvo el gen en la parte de proteína secretora del mismo por PCR y, después de la purificación, se digirió con una enzima de restricción SacI y se ligó al fragmento GAPDHp-Gas. El producto de ligamiento se abrevia a partir de ahora en este documento como "GAPDHp-GAs-ACX". Los cebadores usados en la PCR se presentan como la SEQ ID NO: 65 y SEQ ID NO: 66 en la tabla 4 a continuación.
En esta ocasión, los métodos para la purificación y el ligamiento de los fragmentos de ADN en esta etapa son los mismos que los de la etapa (c).

(g) Introducción en el vector de expresión

El fragmento GAPDHp-GAs-TVX y un vector de expresión de múltiples copias YEp24 (ATCC 7769) para levaduras de gemación se digirieron con las enzimas de restricción XmaI y BamHI (produciendo la primera un fragmento de aproximadamente 1,3 kpb y produciendo la última un fragmento de aproximadamente 7,4 kpb) y, después de la purificación, se ligaron entre sí para obtener un plásmido para producir un mutante de xilanasa II derivado de *T. viride* (a partir de ahora en este documento abreviado como YEp-GAPDHp-GAs-TVX). Similar a lo anterior, el fragmento GAPDHp-GAs-ACX y YEp24 se digirieron con las enzimas de restricción XmaI y BamHI (produciendo la primera un fragmento de aproximadamente 1,5 kpb y produciendo la última un fragmento de aproximadamente 7,4 kpb) y, después de la purificación, se ligaron entre sí para obtener un vector de expresión para producir un mutante de xilanasa I derivado de *A. cellulolyticus* (a partir de ahora en este documento abreviado como YEp-GAPDHp-GAs-ACX).

Los métodos para la purificación y el ligamiento de los fragmentos de ADN en esta etapa son los mismos que los de la etapa (c). El YEp24 está disponible en la American Type Culture Collection, que es una colección de células y microorganismos.

Tabla 4

SEQ ID NO: 55	GACTAGCCCGGGTCGAGTTTATCATTATC
SEQ ID NO: 56	GACGAGAGATCTCCATTTTGTTTATTTATGTG
SEQ ID NO: 57	GACTAGAGATCTATGCAACTGTTCAATTTGCC
SEQ ID NO: 58	CAGCATGAGCTCAGCAGAAACCAGCAAAG
SEQ ID NO: 59	ATGGTTTCCTTCACCTCCCTCCTCGCCGGC
SEQ ID NO: 60	TTAGCTGACGGTAATAGAAGCAGAGCCAGA
SEQ ID NO: 61	ATGGGCATCTCATCTATTCTTCTCTCTGCT
SEQ ID NO: 62	CTATTGGCACTGACTGTAGTAAGCGTTAAA
SEQ ID NO: 63	GATTAGGAGCTCCAGACGATTGGTCCCG
SEQ ID NO: 64	GACTAGGGATCCTTAGCTGACGGTAATAG
SEQ ID NO: 65	GATTATGAGCTCGCTGAGGCGATCAACTAC
SEQ ID NO: 66	GATTAGGGATCCCTATTGGCACTGACTGTAG

(2) Mutagénesis dirigida al sitio

Los mutantes usados en los ejemplos de la invención tenían mutaciones introducidas usando un kit de mutagénesis *in vitro* por PCR LA fabricado por Takara Shuzo Co., Ltd. y usando los vectores de expresión construidos en la etapa (1) como moldes.

Los cebadores usados fueron oligonucleótidos sintetizados

La PCR se realizó usando el vector de expresión YEp-GAPDHp-GAs-TVX como molde y usando la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 6, la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9 y la SEQ ID NO: 10, y la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12, que se proporcionan en la siguiente tabla 5, como cebadores para obtener un vector de expresión de xilanasa mutante YEp-GAPDHp-GAs-TVX01.

Además, usando el vector de expresión YEp-GAPDHp-GAs-ACX como molde y usando las secuencias de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, que se proporcionan en la siguiente tabla 5, como cebadores, se obtuvo YEp-GAPDHp-GAs-L154M que tenía un resto de aminoácido sustituido que era una metionina sustituida en un resto de leucina en la posición 154 de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias.

Similar a lo anterior, se obtuvo YEp-GAPDHp-GAs-ACX01 usando el vector de expresión YEp-GAPDHp-GAs-ACX como molde y usando las secuencias de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14, las secuencias de la SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, las secuencias de la SEQ ID NO: 17 y la SEQ ID NO: 18, las secuencias de la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 20, las secuencias de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, las secuencias de la SEQ ID NO: 23 y la SEQ ID NO: 24, las secuencias de la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26, las secuencias de la SEQ ID NO: 27 y la SEQ ID NO: 28 y las secuencias de la SEQ ID NO: 29 y la SEQ ID NO: 30, que se proporcionan en la siguiente tabla 5 como cebadores.

Similar a lo anterior se obtuvo YEp-GAPDHp-GAs-ACX02 usando el vector de expresión YEp-GAPDHp-GAs-ACX como molde y usando las secuencias de la SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16, las secuencias de la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 22, las secuencias de la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 32 y las secuencias de la SEQ ID NO: 33 y la SEQ ID NO: 34, que se proporcionan en la siguiente tabla 5 como cebadores.

Similar a lo anterior se obtuvo YEp-GAPDHp-GAs-ACX03 usando el vector de expresión YEp-GAPDHp-GAs-ACX como molde y usando las secuencias de la SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, las secuencias de la SEQ ID NO: 31 y la SEQ ID NO: 32, las secuencias de la SEQ ID NO: 35 y la SEQ ID NO: 36, las secuencias de la SEQ ID NO: 37 y la SEQ ID NO: 38 y las secuencias de la SEQ ID NO: 39 y la SEQ ID NO: 40, que se proporcionan en la siguiente tabla 5 como cebadores.

Se transformaron células competentes de *Escherichia coli* HB101 (fabricadas por Toyobo Co., Ltd.) con los plásmidos que contenían xilanasas mutantes para obtener transformantes.

Los plásmidos se prepararon a partir de las células bacterianas usando un método de extracción con SDS alcalina, y las secuencias de bases de las partes del gen de xilanasa de las mismas se determinaron usando un secuenciador de ADN, como resultado de lo cual se confirmó la introducción de sustituciones de aminoácido en la región codificante del gen de xilanasa de cada uno de YEp-GAPDHp-GAs-TVX y YEp-GAPDHp-GAs-ACX, que son moldes.

Tabla 5

SEQ ID NO: 5	GTACACCCTCGGCCCCGGCGGCCAG
SEQ ID NO: 6	CGGGGCCGAGGGTGTACGTCACGCC
SEQ ID NO: 7	CAAGAACAGGGTCATCAACTTCTCG
SEQ ID NO: 8	GATGACCCTGTTCTTGGTGCCGG
SEQ ID NO: 9	CGTGACGTTCACCCTCGGCCCCGGC
SEQ ID NO: 10	CGAGGGTGAACGTCACGCCGCCGTG
SEQ ID NO: 11	CTCGGGCAGCTTTGTCGGCGGCAAG
SEQ ID NO: 12	CGACAAAGCTGCCCGAGTTGGACCAG
SEQ ID NO: 13	CATCAACTACGATACGCAGGGGGAC
SEQ ID NO: 14	CCCTGCGTATCGTAGTTGATGGAG
SEQ ID NO: 15	GATACGCAGAGGGACTTTGTGGTGG
SEQ ID NO: 16	CAAAGTCCCTCTGCGTATCGTAGTTG
SEQ ID NO: 17	GATACCAGTCTGTCGGCACACACAAG
SEQ ID NO: 18	GCCGACAGACTGGTATCCGTCGTG
SEQ ID NO: 19	GATCCGCCGAAGCCCCCGGACGAG
SEQ ID NO: 20	GGGGGCTTCGGCGGATCGAGATGTAC
SEQ ID NO: 21	CAGGCGGGCATGAATCTCGGCACAATG
SEQ ID NO: 22	CCGAGATTCATGCCCGCCTGCGCCC
SEQ ID NO: 23	GCAGCGGCACTGGACAAATCTCGCTC
SEQ ID NO: 24	GATTTGTCCAGTGCCGCTGCCGCTCC
SEQ ID NO: 25	CACGGGTCACACCAGCACGAGCAC
SEQ ID NO: 26	GTGCTGGTGTGACCCGTGGGTGTG
SEQ ID NO: 27	GTCACACCAACACGAGCACCGCTCC
SEQ ID NO: 28	GTGCTCGTGTTGGTGTGACCCGTGG
SEQ ID NO: 29	CAATGCGGAGAAATTGGCTGGACCGG
SEQ ID NO: 30	CCAGCCAATTTCTCCGCATTGTCCCC
SEQ ID NO: 31	CTTTCTCCGTCAACTACAATACGC
SEQ ID NO: 32	GTAGTTGACGGAGAAAGAACCCG
SEQ ID NO: 33	GTCAACTACGATACGCAGGGGGACTTTG
SEQ ID NO: 34	CCCTGCGTATCGTAGTTGACGGAGAAAG

SEQ ID NO: 35	CTCCTTCACGGCCTCGGGTCGGGTG
SEQ ID NO: 36	CCGAGGCCGTGAAGGAGCCGCTGTAG
SEQ ID NO: 37	CGCTTACCACAGTCAGTGCCAATAG
SEQ ID NO: 38	CACTGACTGTGGTAAGCGTTAAAGTAC
SEQ ID NO: 39	CAGTCAGAGCCAATAGGGATCCTC
SEQ ID NO: 40	CCTATTGGCTCTGACTGTAGTAAGC

(3) Transformación en levadura y producción de xilanasa mutante

Se transformaron células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 con los vectores de expresión que contienen xilanasa mutante construidos en la etapa (2) usando un kit de transformación de levadura rápida (G-Biosciences) y se cultivaron en un medio de agar SD-Ura (base de nitrógeno de levadura al 0,67 % sin aminoácidos (Difco Co., Ltd.), glucosa al 2 %, casaminoácido al 0,5 %, complemento Ura DO al 0,077 % (Clontech Co., Ltd.), agar al 2 % y agua desionizada) a 30 °C durante 48 horas. Los mutantes resultantes se enumeran en la tabla 6.

Tabla 6

Nombre del mutante	SEQ ID NO:	N.º de aminoácidos	Antes de la mutación	Después de la mutación
TVX01	1	27	Tyr	Phe
	1	29	Asn	Leu
	1	44	Asn	Ser
	1	58	Lys	Arg
ACX01	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
	2	90	Thr	Ser
	2	132	Gln	Arg
	2	154	Leu	Met
	2	174	Ser	Thr
	2	195	Pro	His
	2	197	Ser	Asn
	2	217	Gly	Glu
ACX02	2	30	Ile	Val
	2	33	Asn	Asp
	2	36	Gly	Arg
	2	154	Leu	Met
ACX03	2	30	Ile	Val
	2	59	Ser	Thr
	2	154	Leu	Met
	2	239	Tyr	His
	2	242	Cys	Ser

(4) Evaluación de la estabilidad de las xilanasas mutantes

La colonia obtenida se inoculó en un medio líquido de SD-Ura (siendo la composición del medio igual que la composición del medio mencionado anteriormente excepto en que el contenido de glucosa era de un 4 %, que no contenía agar y que el medio SD-Ura era un medio líquido), y se sometió a precultivo a 30 °C durante 24 horas. Después de ello, el precultivo resultante se inoculó en una cantidad de un 2 % y se sometió a cultivo principal durante 48 horas. Después, el sobrenadante, que contenía la xilanasa mutante, se centrifugó y después se sometió a tratamiento con calor de 50 °C a 55 °C y se midió la actividad residual de la enzima de acuerdo con el método de medición descrito en el ejemplo 1.

<TVX01>

La xilanasa mutante producida por el método descrito en la etapa (2) del ejemplo 2 se sometió a tratamiento con calor a 50 °C durante un periodo de tiempo que varió de 0 horas a 72 horas, y después se midió con respecto a la actividad residual de la misma usando el método de medición descrito en el ejemplo 1. Los resultados se proporcionan en la tabla 7. El símbolo WT representa de tipo silvestre y los símbolos F. L. S y R representan respectivamente, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias, sustitución de un resto de tirosina en la posición 27 con fenilalanina, sustitución de un resto de asparagina en la posición 29 con un resto de leucina, sustitución de un resto de asparagina en la posición 44 con un resto de serina y sustitución de un resto de lisina en la posición 58 con un resto de arginina. Para la producción de una xilanasa mutante (tabla 7 (e)) en que un resto de tirosina en la posición 27 estuviera sustituido con un resto de fenilalanina, se usaron los cebadores de la SEQ ID NO: 41 y la SEQ ID NO: 42 proporcionados en la tabla 8.

Tabla 7

N.º	Nombre de la xilanasa	Velocidad inicial de reacción antes del tratamiento con calor (Respecto a WT)	Actividad residual [%]			
			0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
(a)	WT	1,00	100 %	0 %	0 %	0 %
(b)	FLSR (TVX01)	0,70	100 %	97 %	86 %	75 %
(c)	FLR	0,48	100 %	84 %	74 %	55 %
(d)	LR	0,66	100 %	0 %	0 %	0 %
(e)	F	0,79	100 %	0 %	0 %	0 %
(f)	L	0,57	100 %	0 %	0 %	0 %
(g)	S	0,99	100 %	0 %	0 %	0 %
(h)	R	0,96	100 %	0 %	0 %	0 %

Tabla 8

SEQ ID NO: 41	CGTGACGTTCACCAATGGCCCCGGC
SEQ ID NO: 42	CATTGGTGAACGTCACGCCGCCGTG

Las xilanasas mutantes en que se remplazó un resto de aminoácido específico o restos de aminoácido específicos por restos de aminoácido sustituidos que se cree que proporcionan estabilización frente al calor y se describen en el folleto del documento WO 2007/115391, el folleto del documento WO 2001/27252 y el folleto del documento WO 2005/108565 se inactivaron completamente después de 24 horas, como se demuestra en las filas (d), (f) y (h) de la tabla 7.

Además, como se muestra en las filas (e) y (g) de la tabla 7, las xilanasa mutante que tiene un resto aminoácido sustituido que es un resto de fenilalanina sustituido en un resto de tirosina en la posición 27 o la xilanasa mutante que tiene un resto de aminoácido sustituido que es un resto de serina sustituido en un resto de asparagina en la posición 44 también se inactivaron completamente después de 24 horas.

Sin embargo, en el caso de la xilanasa mutante que tiene restos de aminoácido sustituidos que son un resto de leucina sustituido en un resto de asparagina en la posición 29 y un resto de arginina sustituido en un resto de lisina en la posición 58 (fila (d) de la tabla 7), la sustitución adicional de un resto de tirosina en la posición 27 con un resto de fenilalanina produjo una mejora de la actividad residual y proporcionó una actividad residual de un 50 % o mayor incluso después de 72 horas (fila (c) de la tabla 7).

Además, la sustitución de un resto de asparagina en la posición 44 en esta xilanasa mutante con un resto de serina provocó que proporcionara una actividad cercana a la del tipo silvestre (fila (a) de la tabla 7) y una actividad residual de un 70 % incluso después de 72 horas (fila (b) de la tabla 7).

Muchos de los mutantes que incluyen los cuatro sitios de mutación de acuerdo con la invención tuvieron propiedades casi equivalentes a las de TVX01. Los ejemplos específicos de esos mutantes incluyen mutantes que incluyen los cuatro sitios de mutación, así como que incluyen, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 del listado de secuencia, la sustitución de un resto de glicina en la posición 47 con un resto de cisteína, la sustitución de un resto de glutamina en la posición 52 con un resto de lisina, la sustitución de un resto de valina en la posición 59 con un resto de isoleucina, la sustitución de un resto de asparagina en la posición 67 con un resto de ácido aspártico, la sustitución de un resto de asparagina en la posición 69 con un resto de isoleucina, la sustitución de un resto de serina en la posición 80 con un resto de alanina, la sustitución de un resto de asparagina en la posición 97 con un resto de ácido aspártico, la sustitución de un resto de leucina en la posición 105 con un resto de metionina, la sustitución de un resto de treonina en la posición 109 con un resto de alanina, la sustitución de un resto de treonina en la posición 120 con un resto de arginina, la sustitución de un resto de tronina en la posición 143 con un resto de isoleucina, la sustitución de un resto de asparagina en la posición 151 con un resto de serina, la sustitución de un resto de serina en la posición 161 con un resto de leucina o la sustitución de un resto de serina en la posición 186 con un resto de treonina.

< L154M> (no de acuerdo con la presente invención)

Usando el método escrito en la etapa (3) del ejemplo 2, la levadura se transformó con el vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de una xilanasa mutante, y que se produjo por el método descrito en la etapa (2) del ejemplo 2. La levadura que produce la xilanasa mutante se sometió a cultivo en el líquido. El sobrenadante de la solución de cultivo se sometió a tratamiento con calor a 50 °C durante 24 horas y después se midió la actividad residual por el método de medición descrito en el ejemplo 1.

La actividad residual de la xilanasa mutante fue de un 50 %. La xilanasa mutante también mostró una velocidad inicial de reacción antes del tratamiento con calor que es 1,13 veces la del tipo silvestre.

<ACX01, ACX02 y ACX03> (no de acuerdo con la presente invención)

Usando el método descrito en la etapa (3) del ejemplo 2, la levadura se transformó con el vector de expresión que incluye un ácido nucleico representado por la secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de una xilanasa mutante, y que se produjo por el método descrito en la etapa (2) del ejemplo 2. La levadura que produce la xilanasa mutante se sometió a cultivo en líquido. El sobrenadante de la solución de cultivo se sometió a tratamiento con calor a 50 °C durante un periodo de tiempo que varió de 0 a 48 horas, y después se midió la actividad residual por el método de medición descrito en el ejemplo 1. Los resultados se proporcionan en la tabla 9. En la tabla 9, WT representa de tipo silvestre.

El medio líquido usado en este proceso es un medio SD (sin Ura) que contenía un 4 % de glucosa.

Tabla 9

N.º	Nombre de la xilanasa	Velocidad inicial de reacción antes del tratamiento con calor (Respecto a WT)	Actividad residual [%]			
			0 horas	16 horas	24 horas	48 horas
(i)	WT	1,00	100 %	0 %	0 %	0 %
(j)	ACX01	2,27	100 %	89 %	76 %	59 %
(k)	ACX02	0,92	100 %	99 %	92 %	66 %
(l)	ACX03	0,80	100 %	85 %	79 %	61 %

La xilanasa derivada de *A. cellulolyticus* de tipo silvestre se inactivó completamente después del tratamiento con calor durante 16 horas (fila (i) de la tabla 9). Por el contrario, las xilanasas mutantes mostraron una actividad residual mejorada, y las xilanasas mutantes mostraron una actividad residual de un 50 % o mayor incluso después de 48 horas (filas (j), (k) o (l) de la tabla 9). ACX02 y ACX03 (filas (k) y (l) de la tabla 9) también mostraron velocidades iniciales de reacción antes del tratamiento con calor que eran casi equivalentes a la de la xilanasa de tipo silvestre, y ACX01 mostró una actividad casi dos veces tan alta como la de la xilanasa de tipo silvestre (fila (j) de la tabla 9).

Muchos de los mutantes que tienen todos los sitios de mutaciones contenidos en ACX01 muestran propiedades casi equivalentes a las de ACX01. Los ejemplos específicos de los mutantes incluyen un mutante que incluye los sitios de mutación contenidos en ACX01 e incluye, además, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias, la sustitución de un resto de serina en la posición 133 con un resto de asparagina y la sustitución de un resto de glutamina en la posición 176 con un resto de arginina.

Similar a lo anterior, en el caso de ACX02, muchos de los mutantes que tienen todos los sitios los sitios de mutación contenidos en ACX02 muestran propiedades casi equivalentes a las de ACX02. Los ejemplos específicos de los mutantes incluyen un mutante que incluye los sitios de mutación contenidos en ACX02 e incluye además, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias, la sustitución de un resto de treonina en la posición 90 con un resto de serina, la sustitución de un resto de glutamina en la posición 132 con un resto de arginina, la sustitución de un resto de serina en la posición 133 con un resto de asparagina, la sustitución de un resto de serina en la posición 174 con un resto de treonina, la sustitución de un resto de prolina en la posición 195 con un resto de histidina, la sustitución de un resto de glutamina en la posición 176 con un resto de arginina, la sustitución de un resto de serina en la posición 197 con un resto de asparagina y la sustitución de un resto de glicina en la posición 217 con un resto de ácido glutámico.

Además, muchos de los mutante que incluyen todos los sitios de mutación contenidos en ACX03 muestran propiedades casi equivalentes a las de ACX03. Los ejemplos específicos de los mutantes incluyen un mutante que incluye todos los sitios de mutación contenidos en ACX03 e incluye además la sustitución de un resto de glutamina en la posición 176 en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 en el listado de secuencias con un resto de arginina.

Ejemplos comparativos

Se sabe que la introducción de mutaciones para mejorar la resistencia al calor de una enzima habitualmente disminuye en gran medida la velocidad inicial de reacción, o inactiva completamente la enzima. También en esta solicitud se observó que los mutantes obtenidos mostraban una velocidad de inicio disminuida de reacción en la mayoría de los casos, aunque la resistencia al calor de los mismos estaba mejorada. Un ejemplo de ello se proporciona en la tabla 10, en que WT representa de tipo silvestre y MT representa un mutante.

Estos mutantes se produjeron usando la técnica descrita en etapa (2) del ejemplo 2.

Se obtuvo MT1 usando el plásmido YEp-GAPDHp-GAs-TVX como molde y usando las secuencias de la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 44, las secuencias de la SEQ ID NO: 45 y la SEQ ID NO: 46 y las secuencias de la SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 48, que se proporcionan en la siguiente tabla 11, como cebadores.

Se obtuvo MT2 usando el plásmido YEp-GAPDHp-GAs-TVX como molde y usando las secuencias de la SEQ ID NO: 7 y la SEQ ID NO: 8, las secuencias de la SEQ ID NO: 47 y la SEQ ID NO: 48 y las secuencias de la SEQ ID NO: 49 y la SEQ ID NO: 50, que se proporcionan en la siguiente tabla 11, como cebadores.

Se obtuvo MT3 usando el plásmido YEp-GAPDHp-GAs-TVX como molde y usando las secuencias de la SEQ ID NO: 51 y la SEQ ID NO: 52, y las secuencias de la SEQ ID NO: 53 y la SEQ ID NO: 54, que se proporcionan en la siguiente tabla 11, como cebadores.

Los sitios de mutación de MT1 de la tabla 10 indican que, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias, un resto de fenilalanina está sustituido en un resto de tirosina en la posición 13 (Tyr13Phe), un resto cisteína está sustituido en un resto de glicina en la posición 47 (Gly47Cys) y un resto de serina está sustituido en un resto de asparagina en la posición 151 (Asn151Ser).

Los sitios de mutación de MT21 indican que, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en el listado de secuencias, un resto de isoleucina está sustituido en un resto de valina en la posición 46 (Val46Ile), un resto de arginina está sustituido en un resto de lisina en la posición 58 (Lys58Arg) y un resto de serina está sustituido en un resto de asparagina en la posición 151 (Asn151 Ser).

Los sitios de mutación de MT3 indican que, en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el listado de secuencias, un resto de cisteína está sustituido en un resto de serina en la posición 100 (Ser100Cys) y un resto de cisteína está sustituido en un resto de asparagina en la posición 144 (Asn144Cys).

Tabla 10

Nombre de la xilanasa	Sitios de mutación	Actividad residual (Respecto a la de antes del tratamiento con calor)	Velocidad inicial de reacción antes del tratamiento con calor (Respecto a WT)
		Después de 16 horas	Antes del tratamiento con calor
WT *(T. viride)*	-	5 %	1,00
MT1 *(T. viride)*	Tyr13Phe+Gly47Cys+Asn151Ser	69 %	0,38
MT2 *(T. viride)*	Val46Ile+Lys58 Arg+Asn151 Ser	39 %	0,33
WT (A. *Cellulolyticus)*	-	63 %	1,00
MT3 (A. *Cellulolyticus)*	Ser100Cys+Asn144Cys	84 %	0,25

Tabla 11

SEQ ID NO: 43	CAACAACGGCTTCTTCTACTCGTACTG
SEQ ID NO: 44	CGAGTAGAAGAAGCCGTTGTTGAAGCC
SEQ ID NO: 45	CAACTTTGTCTGCGGCAAGGGATGG
SEQ ID NO: 46	CCATCCCTTGCCGCAGACAAAGTTG
SEQ ID NO: 47	CTCCGTCAGCACGGCGAACCAC
SEQ ID NO: 48	GTGGTTCGCCGTGCTGACGGAG
SEQ ID NO: 49	GCAACTTTATCGGCGGCAAGGGATG
SEQ ID NO: 50	CTTGCCGCCGATAAAGTTGCCCGAG
SEQ ID NO: 51	CACTGTGACGTGCGACGGCGGCAC
SEQ ID NO: 52	CCGCCGTCGCACGTCACAGTGCC
SEQ ID NO: 53	CCGTGCAGTGCCACTTCAATGCC
SEQ ID NO: 54	CATTGAAGTGGCACTGCACGGTAAC

Ejemplo 3: Producción en masa de TVX01 y ACX01 usando *T. viride* como hospedador.

(1) Producción en masa de TVX01 usando *T. viride*

(a) Construcción del plásmido TVX01-pCB1

Usando la secuencia de bases que codifica la xilanasa mutante TVX01 obtenida en el ejemplo 2 como molde, se obtuvo la secuencia de ADN de la parte xilanasa por PCR.

Los cebadores usados en la PCR se presentaron como la SEQ ID NO: 67 y la SEQ ID NO: 68 en la siguiente tabla 12.

Usando la longitud completa del gen de xilanasa derivado de *T. viride* obtenido en la etapa (1)(d) del ejemplo 2 como molde, se obtuvo la secuencia de ADN de la parte señal por PCR. Los cebadores usados en la PCR se presentan como la SEQ ID NO: 69 y la SEQ ID NO: 70 en la siguiente tabla 12.

La secuencia de ADN de la parte de secuencia señal y la secuencia de ADN de la parte xilanasa se ligaron juntas usando un método de PCR, para obtener una secuencia que incluye el sitio StuI en una secuencia en dirección 5' del codón de inicio de la parte de secuencia señal y un sitio XhoI en una secuencia en dirección 3' del codón de parada.

Los cebadores usados en la PCR se presentan como la SEQ ID NO: 71 y la SEQ ID NO: 72 en la siguiente tabla 12. El fragmento de ADN de 0,7 kpb amplificado se insertó en un vector de expresión pCR2.1-TOPO usando un kit de clonación TOPO TA (fabricado por Invitrogen Co., Ltd.) de acuerdo con el protocolo adjunto al kit, como resultado del cual se obtuvo un plásmido TOPO-TVX01.

Tabla 12

SEQ ID NO: 67	CAGACGATTGGTCCCGGCACGGGCTTCAACAACGGCTACT
SEQ ID NO: 68	CCCCTCGAGTTAGCTGACGGTAATAGAAGCAGAGC
SEQ ID NO: 69	GGGAGGCCTGCGCATCATGGTTTCCTTCACCTCCC
SEQ ID NO: 70	GTGCCGGGACCAATCGTCTGGCGCTTTTCAACGTCCACGG
SEQ ID NO: 71	GGGAGGCCTGCGCATCATGGTTTCCTTCACCTCCC
SEQ ID NO: 72	CCCCTCGAGTTAGCTGACGGTAATAGAAGCAGAGC

El plásmido TOPO-TVX01 se escindió con StuI y XhoI para obtener un fragmento génico TVX01-N que tiene aproximadamente 0,7 kpb. Por separado, el pCBl-Eg3X-hphless (folleto del documento WO 2011/021616) se escindió con StuI y XhoI y se recuperó un fragmento que tenía una longitud de aproximadamente 7 kpb. El fragmento recuperado se ligó al fragmento génico TVX01-N que tiene una longitud de aproximadamente 0,7 kpb usando una ADN ligasa (fabricada por Takara Shuzo Co., Ltd.) para producir un plásmido TVX01-pCB1. Respecto a las condiciones de reacción para la enzima y similares, se adoptaron las condiciones especificadas en el manual de instrucciones adjunto al kit. El plásmido TVX01-pCB1 se construyó para que expresara TVX01 usando su propio codón de inicio en el hospedador *T. viride*.

(b) Producción del transformante de *T. viride* usando el plásmido TVX01-pCB1

La transformación de *T. viride* con el plásmido TVX01-pCB1 obtenido en la etapa (1)(a) del ejemplo 3 se realizó de acuerdo con un método divulgado en el folleto del documento WO 2011/021616. La transformación se realizó de acuerdo con un método de cotransformación usando *T. viride* cepa 2, que es una cepa que carece del gen de la biosíntesis de uracilo (pyr4), como hospedador y un gen pyr4 de *Neurospora crassa* como marcador de selección. La *T. viride* cepa 2 puede obtenerse de acuerdo con un método divulgado en el número de párrafo [102] de la memoria descriptiva de la patenta japonesa n.º 4644603. Específicamente, como se describe en el párrafo [0102] de la memoria descriptiva de la patente japonesa n.º 4644603, se irradió una suspensión de esporas de la cepa de *Trichoderma viride* MC300-1 (PERM BP-6047) a aproximadamente 10^9 UFC/ml, mientras se agitaba suavemente, con radiación emitida de dos lamparas de UV dispuestas a una altura de 30 cm. La suspensión de esporas después de la radiación UV se aplicó a un medio de selección y se cultivó durante 7 días a 28 ºC. Se seleccionó una cepa que creció, obteniendo de ese modo *T. viride* cepa 2 como cepa que requiere uracilo de *Trichoderma viride*. El medio de selección tenía una composición de un medio mínimo [dihidrogenofosfato de potasio al 0,2 %, sulfato de amonio al 0,4 %, urea al 0,03 %, sulfato de magnesio heptahidrato al 0,03 %, cloruro de calcio al 0,03 %, glucosa al 0,5 %, agar al 2,5 % y oligoelementos al 0,01 % (preparados por disolución de 5 mg de sulfato de hierro heptahidrato, 1,56 mg de sulfato de manganeso heptahidrato, 1,4 mg de sulfato de cinc heptahidrato y 2 mg de cloruro de cobalto en 1 l de agua)] complementado con 10 µg/ml de uridina y 1 mg/ml de ácido 5-fluoroorótico.

La *T. viride* cepa 2 se suspendió en una solución enzimática que forma protoplastos (1 mg/ml de β-glucuronidasa, 0,3 mg/ml de quitinasa, 0,3 mg/ml de ZIMOLIASA y 0,5 mol/l de sacarosa), para proporcionar protoplastos de los micelios. La suspensión obtenida se filtró y se centrifugó, después de ello se lavó con una solución tamponante SUTC (0,5 mol/l de sacarosa, 10 mmol/l de cloruro de calcio y 10 mmol/l de Tris-HCl (pH: 7,5)).

Los protoplastos se suspendieron en 100 µl de una solución tamponante SUTC y después se añadió a la misma una solución de ADN en una cantidad de 10 µl que contenía 10 µg del plásmido TVX01-pCBl y una solución de ADN en una cantidad de 10 µl que contenía el gen pyr4. La mezcla resultante se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron a la misma 400 µl de una solución de PEG (que contenía PEG4000 al 60 %, 10 mmol/l de cloruro de calcio y 10 mmol/l de Tris-HCl (pH: 7,5)) y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Después, se añadió a la misma una solución tamponante SUTC en una cantidad de 10 ml y la mezcla resultante se centrifugó. Los protoplastos recogidos se suspendieron en 1 ml de solución tamponante SUTC y se superpusieron individualmente partes de 200 µl de la misma, junto con agar blando en un medio mínimo que contenía 0,5 mol/l de sacarosa. Después de cultivar a 28 ºC durante 5 días, se inocularon de nuevo en un medio mínimo las colonias que habían crecido, y las colonias formadas en el mismo se usaron como transformantes.

(c) Cultivo e identificación de transformante transformado con TVX01-pCB1

Las cepas que crecieron en el medio mínimo después de la introducción del plásmido TVX01-pCB1 se seleccionaron y se cultivaron de acuerdo con un método divulgado en el documento WO 98/11239. La solución de cultivo obtenida

se centrifugó para separar el sobrenadante de cultivo de las células microbianas y el sobrenadante de cultivo se dejó que pasara a través de un filtro (tamaño de poro: 0,2 µm) para la filtración y esterilización, preparando de ese modo una solución de sobrenadante de cultivo. La solución de sobrenadante de cultivo preparada se separó por electroforesis usando minigel de SDS-PAGE al 12 % (fabricado por TEEKO Co., Ltd.), y se seleccionó un sobrenadante de cultivo del que se detectó una banda de TVX01. La solución de sobrenadante de cultivo seleccionada se llamó TVX01 de producción en masa.

(2) Producción en masa de ACX02 usando *T. viride* (no de acuerdo con la invención)

(a) Modificación de codones del gen ACX02 adecuado para expresión en *T. viride*

Para posibilitar que el gen ACX02 se exprese fuertemente como proteína activa en *T. viride*, se produjo un ADN que tenía cambios en las bases en 24 posiciones en total la secuencia señal de *A. cellulolyticus* y el gen ACX02. En la tabla 13, las posiciones de las bases para la secuencia llamada ACX02 se refiere a las posiciones de las bases en un gel de xilanasa de *A. cellulolyticus* de tipo silvestre, que se presenta como la SEQ ID NO: 4. Las posiciones de las bases para la secuencia llamada secuencia señal de *A. cellulolyticus* se refiere a la posición de bases en la SEQ ID NO: 73.

Tabla 13

Nombre de la secuencia	Posición de la base	Antes de la modificación	Después de la modificación
Secuencia señal de *A. cellulolyticus*	12	A	C
	42	G	T
	66	A	C
	90	G	C
ACX02	37	A	T
	38	G	C
	39	T	C
	78	T	A
	81	T	C
	106	A	C
	108	G	C
	138	A	C
	279	A	C
	312	A	C
	405	G	C
	474	A	C
	495	A	C
	552	T	C
	573	A	C
	648	G	A
	663	C	G
	718	A	T
	719	G	C
	720	T	C

Este gen ACX02 modificado era un gen que se diseñó considerando la distribución de las frecuencias de uso de los codones en *T. viride*. Este gen ACX02 modificado se sintetizó artificialmente por Gene Design, Inc. En la síntesis artificial, el diseño se realizó de modo que se incluyeron EcoRI y StuI en la secuencia en dirección 5' del codón de inicio y de modo que se incluyeran XhoI y HindIII en dirección 3' del codón de parada. Como resultado, se obtuvo un plásmido pACX02, en que se insertó el gen ACX02 de codones modificados en EcoRI/HindIII de pUC19.

(b) Construcción del plásmido ACX02-pCB1

El plásmido pACX02 se escindió con StuI y XhoI para obtener un fragmento génico ACX02-N que tenía una longitud de aproximadamente 850 pb. Por separado, se escindió pCBI-Eg3X-hphless (folleto del documento WO 2011/021616) con StuI y XhoI y se recuperó un fragmento que tenía una longitud de aproximadamente 7 kpb. El fragmento recuperado se ligó al fragmento génico ACX02-N que tiene una longitud de aproximadamente 850 pb usando una ADN ligasa (Takara Shuzo Co., Ltd.), para producir un plásmido ACX02-pCB1. Las condiciones de reacción para la enzima y similares se establecieron a las condiciones especificadas en el manual de instrucciones adjunto al kit. El plásmido ACX02-pCB1 tenía una configuración de modo que ACX02 se expresaría en el hospedador *Trichoderma viride* usando su propio codón de inicio.

(c) Producción de transformante de *Trichoderma viride* transformado con el plásmido ACX02-pCB1

La transformación de *Trichoderma viride* con el plásmido ACX02-pCB1 obtenido en la etapa (2)(b) del ejemplo 3 se realizó de acuerdo con el método divulgado en el folleto del documento WO 2011/021616. La transformación se realizó de acuerdo con un método de cotransformación usando *T. viride* cepa 2, que es una cepa que carece del gen de la biosíntesis de uracilo (pyr4) como hospedador y un gen pyr4 de *Neurospora crassa* como marcador de selección. La *Trichoderma viride* cepa 2 se suspendió en una solución enzimática que forma protoplastos (1 mg/ml de β-glucuronidasa, 0,3 mg/ml de quitinasa, 0,3 mg/ml de zimoliasa y 0,5 mol/l de sacarosa), para proporcionar protoplastos de los micelios. La suspensión se filtró y centrifugó y, después de ello, se lavó con una solución tamponante SUTC (0,5 mol/l de sacarosa, 10 mmol/l cloruro de calcio y 10 mmol/l de Tris-HCl (pH: 7,5)).

Los protoplastos se suspendieron en 100 µl de solución tamponante SUTC y después se añadió a la misma una solución de ADN en una cantidad de 10 µl que contenía 10 µg del plásmido ACX02-pCB1 y una solución de ADN en una cantidad de 10 µl que contenía el gen pyr4. La mezcla resultante se dejó reposar en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron a la misma 400 µl de una solución de PEG (que contenía PEG4000 al 60 %, 10 mmol/l de cloruro de calcio y 10 mmol/l de Tris-HCl (pH: 7,5)) y se dejó reposar en hielo durante 20 minutos. Después, se añadió a la misma una solución tamponante SUTC en una cantidad de 10 ml, y la mezcla resultante se centrifugó. Los protoplastos recogidos se suspendieron en 1 ml de solución tamponante SUTC y se superpusieron individualmente partes de 200 µl de la misma, junto con agar blando, en un medio mínimo que contenía 0,5 mol/l de sacarosa. Después de cultivar a 28 ºC durante 5 días, se inocularon de nuevo en un medio mínimo las colonias que habían crecido, y las colonias formadas en el mismo se usaron como transformantes.

(d) Cultivo e identificación de transformante transformado con ACX02-pCB1

Se seleccionaron las cepas que crecieron en el medio mínimo después de la introducción del plásmido ACX02-pCB1 y se cultivaron de acuerdo con un método divulgado en el documento WO 98/11239.

La solución de cultivo obtenido se centrifugó para separar el sobrenadante de cultivo de las células microbianas y el sobrenadante de cultivo se dejó que pasara a través de un filtro (tamaño de poro: 0,2 µm) para la filtración y la esterilización, preparando de ese modo una solución de sobrenadante de cultivo. La solución de sobrenadante de cultivo preparada se sometió a SDS-PAGE y se seleccionó un sobrenadante de cultivo del que se detectó una banda de ACX02. La solución de sobrenadante de cultivo seleccionada se llamó ACX02 de producción en masa.

Ejemplo 4: Transición de estabilidad de TVX01 junto con cambios en la temperatura y el pH

El siguiente experimento se realizó usando la TVX01 producida en masa por el método empleado en el ejemplo 3. Se mezcló una solución tamponante 200 nM (especificada a continuación) y xilanasa juntos en una relación de 1:1 y la mezcla se trató durante un periodo predeterminado de tiempo a diversas temperaturas, y después se dejó reposar en un baño de hielo durante 5 minutos. Después, se midió la actividad residual de acuerdo con el método empleado en el ejemplo 1. Las soluciones tamponantes usadas en este proceso fueron una solución tamponante de citrato de sodio (pH: 4,5), una solución tamponante de Tris-HCl (pH: de 8 a 9) y una solución tamponante de glicina de sodio (pH: 10).

La TVX01 retuvo una actividad de un 86 % incluso después del tratamiento con calor a pH 4,5 y 50 ºC durante 72 horas. Además, la TVX01 retuvo una actividad de un 68 % incluso después del tratamiento con calor a pH 5,5 (el pH de la solución madre de xilanasa mutante) y a una temperatura mayor, 70 ºC, durante 5 minutos. Ambas condiciones son condiciones en que el tipo silvestre perdería completamente su actividad; por el contrario, el mutante mostró actividad residual mejorada en condiciones ácidas de alta temperatura.

Después del tratamiento con calor a 50 ºC y un pH de 8 a 10 durante 60 minutos, la actividad residual del tipo silvestre fue de un 28 % a pH 8, fue de un 8 % a pH 9 y se observó inactivación completa a pH 10, mientras que la actividad residual del mutante fue de un 83 % a pH 8, fue de un 60 % a pH 9 y fue de un 56 % incluso a pH 10. Además, incluso después del tratamiento con calor a 60 ºC durante 60 minutos, en que el tipo silvestre pierde completamente su actividad, la xilanasa mutante retuvo una actividad de un 30 % a pH 8, una actividad de un 17 % a pH 9 y una actividad de un 10 % a pH 10, lo que demuestra que la xilanasa mutante muestra una actividad residual mejorada también en las condiciones básicas de alta temperatura.

Como se describe anteriormente, TVX01 de acuerdo con la invención mostraba una mejora significativa en la actividad residual en condiciones donde la enzima de tipo silvestre se inactiva significativamente, tal como pH 4,5 o pH de 8 a 10 con una temperatura de 50 ºC a 70 ºC.

Ejemplo 5: Cambio de la estabilidad de ACX02 debido a cambios en la temperatura y el pH (no de acuerdo con la invención)

Se realizó un experimento de la misma manera que en el ejemplo 4, pero usando la ACX02 producida en masa por el método empleado en el ejemplo 3.

La ACX02 producida en masa retenía una actividad de un 84 % incluso después del tratamiento con calor a pH 4,5 y 50 ºC durante 72 horas. Una xilanasa de tipo silvestre tratada de la misma manera retenía una actividad que era tan baja como de un 45 %. Por tanto, se demuestra que la xilanasa mutante muestra una actividad residual mejorada en las condiciones ácidas de alta temperatura, en comparación con la xilanasa de tipo silvestre.

El tipo silvestre perdía completamente su actividad después del tratamiento con calor a 50 ºC y pH de 8 a 10 durante 60 minutos, mientras que ACX02 retenía una actividad de un 34 % a pH 8, una actividad de un 5 % a pH 9 y una actividad de un 2 % incluso a pH 10, lo que demuestra que ACX02 retiene actividad residual mejorada incluso en las condiciones básicas de alta temperatura.

Como se describe anteriormente, ACX02 no de acuerdo con la invención mostraba una mejora significativa en la actividad residual en condiciones donde la enzima de tipo silvestre se inactiva significativamente, tal como pH 4,5 o pH de 8 a 10 con una temperatura de 50 ºC.

Ejemplo 6: Reacción de sacarificación (1) de materia prima lignocelulósica

Se colocó pasta Kraft blanqueada foliar (LBKP) que tiene un peso seco de 2 g en matraces Erlenmeyer. Después, se añadieron individualmente una solución acuosa de celulasa que contenía la ACX02 producida en masa por el método del ejemplo 3, una solución acuosa de celulasa que contenía TVX01 producida en masa por el método del ejemplo 3, una solución acuosa de celulasa que contenía una xilanasa de tipo silvestre derivada de *T. viride* como control experimental y una solución acuosa de celulasa que contenía una xilanasa de tipo silvestre derivada de *A. cellulolyticus* como control experimental, en sus matraces Erlenmeyer respectivos, de modo que la cantidad de cada solución acuosa de celulasa añadida fuera de 52 mg en términos de peso de proteína. Después, se añadió solución tamponante de citrato de sodio 20 mM (pH 4,5) en cada matraz Erlenmeyer para preparar una solución de reacción en una cantidad de 20 g. Cada uno de los matraces Erlenmeyer se precintó con un tapón de silicona. Después de eso, la solución de reacción se agitó suavemente a 50 ºC y se permitió que continuara una reacción de sacarificación. Los resultados se proporcionan en la tabla 14, en que WT representa la xilanasa de tipo silvestre.

Tabla 14

N.º	Nombre de la xilanasa	Actividad residual [%]
(m)	WT (*T. viride*)	27
(n)	TVX01	90
(o)	WT (*A. cellulolyticus*)	35
(P)	ACX02	90

Después de 72 horas, las xilanasas de tipo silvestre derivadas de *A. cellulolyticus* y *T. viride* mostraron actividades residuales que habían disminuido hasta aproximadamente un 30 % (filas (m) y (o) en la tabla 14); por el contrario, la ACX02 producida en masa y la TVX01 producida en masa mostraron actividades residuales de un 90 % o superior (filas (n) y (p) en la tabla 14).

Ejemplo 7: Reacción de sacarificación (2) de materia prima lignocelulósica

(1) Reacción de sacarificación

Se colocó pasta Kraft blanqueada procedente de follaje (LBKP) que tiene un peso seco de 40 g en matraces separables. Después, se añadieron individualmente una solución acuosa de celulasa que contenía TVX01 producida en masa por el método del ejemplo 3 y una solución acuosa de celulasa que contenía la ACX02 producida en masa por el método del ejemplo 3, en una cantidad de 347 mg en términos de peso de proteína, en sus matraces separables respectivos. Después, se añadió solución tamponante de citrato de sodio 20 mM (pH 4,5) en cada matraz separable, para preparar una solución de reacción en una cantidad de 400 g. Después de eso, la solución de reacción se agitó suavemente a 50 ºC y se permitió que continuara una reacción de sacarificación. La cantidad de monosacárido producido después de que la reacción se realizara durante 72 horas se analizó por HPLC.

<Condiciones de análisis por HPLC>

Analizador: HPLC disponible en JASCO Corporation
Columna: ULTRON PS-80H (300 x 8 mm; fabricada por Shinwa Chemical Co., Ltd.)
Temperatura de análisis: 50 ºC
Fase móvil: Solución acuosa de ácido perclórico a pH 2,1

(2) Recuperación de la enzima

Se centrifugó la solución de reacción de sacarificación (la solución de reacción después de 72 horas de reacción) a 7000 xg y se recuperó el precipitado. La solución sobrenadante de centrifugación restante se trató con una membrana UF disponible en el mercado (nombre del producto: Microza UE Pencil Module AIP-0013D fabricado por

Asahi Kasei Chemicals Corporation) para obtener una fracción concentrada.

(3) Reacción de resacarificación usando la enzima recuperada

El precipitado obtenido por la centrifugación a 7000 xg de la solución de reacción de sacarificación y la fracción concentrada obtenida por el tratamiento con la membrana UF se colocaron en un matraz separable. A continuación, se añadió pasta kraft blanqueada procedente de follaje (LBKP) al mismo en una cantidad de 40 g en términos de contenido de sólido final, y la mezcla resultante se agitó suavemente a 50 ºC y se dejó que continuara una reacción de sacarificación. Después, se analizó la cantidad de monosacárido producido después de 72 horas de reacción por HPLC.

(4) Resultados de la reacción de sacarificación

Después de 72 horas desde el inicio de la primera reacción (la cantidad de veces de reutilización de la enzima: cero veces), la concentración de glucosa y xilosa acumuladas en la solución de reacción de sacarificación que contenía TVX01 fue de 79,1 g/l, en que la concentración de glucosa acumulada en la solución de reacción de sacarificación fue de 65,1 g/l. La concentración de glucosa y xilosa acumuladas en la solución de reacción de sacarificación que contenía la xilanasa derivada de *T. viride* de tipo silvestre fue de 78,0 g/l, en que la concentración de glucosa acumulada en la solución de reacción de sacarificación fue de 64,7 g/l. En la solución de reacción de sacarificación que contenía ACX02, la concentración de glucosa y xilosa acumuladas fue de 61,3 g/l, en que la concentración de glucosa acumulada fue de 49,9 g/l. Las enzimas contenidas en estas soluciones de reacción de sacarificación se reutilizaron para las reacciones de sacarificación por el método descrito anteriormente.

La concentración de glucosa y xilosa acumuladas en el primer ciclo de reutilización fue de 70,7 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía TVX01, 53,3 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía la xilanasa derivada de *T. viride* de tipo silvestre y 53,1 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía ACX02.

La concentración de glucosa acumulada en el primer ciclo de reutilización fue de 58,7 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía TVX01, 45,0 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía la xilanasa derivada de *T. viride* de tipo silvestre y 43,5 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía ACX02.

La concentración de glucosa y xilosa acumulada en el segundo ciclo de reutilización fue de 63,6 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía TVX01, 42,3 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía la xilanasa derivada de *T. viride* de tipo silvestre y 42,6 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía ACX02.

La concentración de glucosa acumulada en el segundo ciclo de reutilización fue de 53,0 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía TVX01, 35,8 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía la xilanasa derivada de *T. viride* de tipo silvestre y 34,6 g/l en la solución de reacción de sacarificación que contenía ACX02.

Los resultados obtenidos se proporcionan como valores relativos suponiendo que la concentración de azúcares acumulados en el ciclo n.º 0 de reutilización es de un 100 %. Los resultados se proporcionan en las tablas 15 y 16, en que WT representa xilanasa de tipo silvestre.

Tabla 15

		Concentración de glucosa y xilosa acumuladas (Valores relativos)		
N.º	Nombre de la xilanasa	Ciclo n.º 0	1.er Ciclo	2.º Ciclo
(m)	WT *(T. viride)*	100	68	54
(n)	TVX01	100	89	80
(p)	ACX02	100	87	70

Tabla 16

		Concentración de glucosa acumuladas (Valores relativos)		
N.º	Nombre de la xilanasa	Ciclo n.º 0	1.er Ciclo	2.º Ciclo
(m)	WT *(T. viride)*	100	70	55
(n)	TVX01	100	90	81
(p)	ACX02	100	87	69

Como se demuestra en la tabla 15, se aclaró que las xilanasas mutantes de TVX01 (de acuerdo con la invención) y ACX01 (no de acuerdo con la invención) son muy adecuadas para usarse en la reacción de sacarificación en que se realiza reutilización de enzimas.

Como se demuestra en la tabla 16, se aclaró que no solamente la eficacia de producción de xilosa, sino también la

eficacia de producción de glucosa se aumenta usando la xilanasa mutante de acuerdo con la invención.

Además, se obtuvieron efectos similares a los anteriores también en casos en que se usaron TVX01 y ACX01 con pasta kraft blanqueada procedente de agujas (NBKP).

Ejemplo 8: Método de blanqueo de pasta

(1) Tratamiento de pasta con xilanasa

Se usa un cartón de leche disponible en el mercado como pasta. La materia prima de cartones de leche es madera de madera blanda diluida, madera remanente generada por la tala, o similares, y es una pasta virgen que contiene lignina, que es un componente colorante.

Se corta un cartón de leche bien lavado en trozos de aproximadamente 5 cm^2 y se sumerge en agua durante un periodo de tiempo de aproximadamente 2 días a aproximadamente 5 días. Después de ello, se retira una película de polietileno sobre la superficie del mismo.

El agua en que se han sumergido los trozos de papel se caliente hasta 50 °C y se añaden individualmente a la misma la xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención y la xilanasa ACX02 no de acuerdo con la invención. Se realiza el mismo tratamiento, pero usando sus xilanasas de tipo silvestre respectivas como controles para comparación. Cada una de las xilanasas usadas en este ejemplo derivan de un hongo filamentoso. La cantidad de xilanasa a añadir se controla para proporcionar una relación de mezcla óptima. Además, el tiempo de tratamiento también se controla para proporcionar un tiempo de tratamiento óptimo. Además, también se prepara una muestra que no se trataría con xilanasa.

Después de eso, se añade un agente de blanqueo que contiene cloro disponible en el mercado, y se deja que los trozos de papel reposen durante medio día a un pH de 7 a 10. Los trozos de papel se lavan bien con agua y se rasgan en trozos pequeños, y se agitan con una cantidad apropiada de agua en una batidora doméstica hasta que los trozos de papel no puedan verse.

Las fibras se procesan en papel usando un aparato de fabricación de papel disponible en el mercado y después se retira el agua del mismo, y se seca el papel.

(2) Medición de blancura

La blancura (JIS Z 8715) del papel producido como se describe anteriormente se mide usando un medidor de blancura espectral UV-visible.

(3) En casos en que se añade la xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención y la xilanasa mutante ACX02 no de acuerdo con la invención, la pasta puede blanquearse incluso en condiciones de pH 7 a pH 10.

Ejemplo 9: Detergente

(1) Limpieza de tela con pelusas

Se usa tela con pelusas vieja como material a lavar. El detergente a usar se prepara añadiendo la xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención o la xilanasa mutante ACX02 no de acuerdo con la invención a un detergente disponible en el mercado. El tratamiento se realiza de la misma manera que anteriormente, pero usando sus xilanasas de tipo silvestre respectivas como controles para comparación. Cada una de las xilanasas usadas en este ejemplo deriva de un hongo filamentoso. Además, también se prepara tela con pelusas vieja no tratada con xilanasa. La cantidad de xilanasa a añadir se controla para proporcionar una relación de mezcla óptima. La cronología de la adición de la misma se establece para que sea simultánea con la adición del detergente.

Se añaden 800 ml de agua en un matraz separable de 1 l, y se añade al mismo el detergente y la xilanasa. El lavado se realiza a 50 °C y un pH de 7 a 10 durante 1 hora mientras se rota el matraz separable a 60 r.p.m. Después de ello, se realiza secado natural.

(2) Medición de grado de eliminación de pelusas

El estado de eliminación de pelusas se observa en un microscopio estereoscópico. Además, se mide el grado de eliminación de pelusas en la tela después del lavado usando un espectrofotómetro.

(3) En casos en que se añade la xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención y la xilanasa mutante ACX01 no de acuerdo con la invención, la formación de pelusas se suprime en las condiciones de pH de 7 a 10 y una temperatura de 50 °C.

Ejemplo 10: Pienso para animales

(1) Producción de pienso para animales

Se añade la xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención o la xilanasa mutante ACX01 no de acuerdo con la invención a un pienso pulverizable para animales experimentales. El tratamiento se realiza de la misma manera, pero usando sus xilanasas de tipo silvestre respectivas como controles para comparación. Cada una de las xilanasas usadas en este ejemplo deriva de un hongo filamentoso. Además, también se prepara pienso pulverizable no tratado con xilanasa. La cantidad de xilanasa a añadir se controla para proporcionar una relación de mezcla óptima y se granula la mezcla.

(2) Medición del grado de descomposición de la pared celular en pienso para animales conformado

Después de permitir que el pienso para animales conformado repose durante una noche, el pienso para animales se corta con una cuchilla disponible en el mercado y se somete a tinción Gram en el portaobjetos preparado, y se observa el grado de coloración de la célula en un microscopio óptico. Además, el pienso para animales se ha dejado reposar durante una noche se mezcla vigorosamente con solución tamponante de citrato de sodio 100 mM (pH 4,5) y se centrifuga a 5000xg durante 15 minutos. Después, retira el sobrenadante y se mide la cantidad de azúcar reductor en el sobrenadante usando el método DNS (Bailey et. al, 1992).

Ejemplo 11: Modificador para la fabricación del pan

(1) Fabricación del pan

Se fabrica pan usando el método de masa directa. La formulación de los ingredientes se proporciona en la siguiente table 17. Para todos los ingredientes, se usan materiales disponibles en el mercado para el hogar.

Tabla 17

Nombre del ingrediente	Cantidad añadida (g)
Harina no tamizada	320
Leche	100
Mantequilla	25
Levadura seca	4
Sal	5
Azúcar	20

La xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención o la xilanasa mutante ACX01 no de acuerdo con la invención se añade como un modificador para la fabricación del pan. El tratamiento se realiza de la misma manera, pero usando sus xilanasas de tipo silvestre respectivas como controles para comparación.

La cronología de la adición de la misma se establece para que sea simultánea con la mezcla de ingredientes. La cantidad de xilanasa se controla para proporcionar una relación de mezcla óptima. Además, también se prepara masa no tratada con xilanasa.

La masa obtenida se dejó fermentar a aproximadamente 37 °C durante un periodo de tiempo de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas hasta que el tamaño de la misma aumentó hasta aproximadamente dos veces el tamaño original, y después se horneó en un microondas.

(2) Observación de la estructura de partículas del pan

El pan horneado se corta con una cuchilla disponible en el mercado y se observó la estructura de partículas en un microscopio estereoscópico.

(3) Medición del volumen de la barra

El pan horneado se deja reposar durante una noche y después se mide el volumen de la barra del pan horneado usando un método de desplazamiento de colza.

(4) En casos en que se añade la xilanasa mutante TVX01 de acuerdo con la invención y la xilanasa mutante ACX01 no de acuerdo con la invención, las xilanasas mutantes tienen capacidad de reacción estable en las condiciones de 35 °C a 40 °C durante 1 a 2 horas en el proceso de fermentación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Mitsui Chemicals, Inc.

Meiji Seika Pharma Co., Ltd

<120> Xilanasa termoestable, método de producción y uso de la misma, y método para producir producto de glucación lignocelulósica

<130> AJW/FP6987325

<140> 12851111.0
<141> 22-11-2012

<150> PCT/JP2012/080387
<151> 22-11-2012

<150> JP2011-257389
<151> 25-11-2011

<150> JP2012-099096
<151> 24-04-2012-04-24

<160> 75

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 190
<212> PRT
<213> *Trichoderma viride*

<400> 1

```
Gln Thr Ile Gly Pro Gly Thr Gly Phe Asn Asn Gly Tyr Phe Tyr Ser
1               5                  10                  15

Tyr Trp Asn Asp Gly His Gly Gly Val Thr Tyr Thr Asn Gly Pro Gly
            20                  25                  30

Gly Gln Phe Ser Val Asn Trp Ser Asn Ser Gly Asn Phe Val Gly Gly
        35                  40                  45

Lys Gly Trp Gln Pro Gly Thr Lys Asn Lys Val Ile Asn Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Thr Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Val 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

Glu Gly Thr Ser Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr 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> 2
<211> 243
<212> PRT
<213> *Acremonium cellulolyticus*

<400> 2

```
Ala Glu Ala Ile Asn Tyr Asn Gln Asn Tyr Ile Ala Ser Gly Ala Asn
1               5                  10                  15

Val Gln Tyr Ser Pro Asn Ile Ala Ala Gly Ser Phe Ser Ile Asn Tyr
            20                  25                  30

Asn Thr Gln Gly Asp Phe Val Val Gly Leu Gly Trp Gln Pro Gly Asp
        35                  40                  45

Ala Asn Pro Ile Thr Tyr Ser Gly Ser Phe Ser Ala Ser Gly Val Gly
    50                  55                  60

Ile Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Thr Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
65                  70                  75                  80

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

Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Trp Glu His Gln Gln
            100                 105                 110

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

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

His Phe Asn Ala Trp Ala Gln Ala Gly Leu Asn Leu Gly Thr Met Asn
145                 150                 155                 160

Tyr Gln Val Leu Ala Val Glu Ser Trp Ser Gly Ser Gly Ser Gly Gln
                165                 170                 175

Ile Ser Leu Ser Lys Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Pro
            180                 185                 190

Thr Gly Pro Thr Ser Thr Ser Thr Ala Pro Ser Ser Gly Gly Thr Gly
        195                 200                 205

Ala Ala Gln Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr
    210                 215                 220

Thr Cys Val Ser Pro Tyr Thr Cys Lys Tyr Phe Asn Ala Tyr Tyr Ser
225                 230                 235                 240

Gln Cys Gln
```

<210> 3
<211> 573
<212> ADN
<213> *Trichoderma viride*

<400> 3

cagacgattg gtcccggcac gggcttcaac aacggctact tctactcgta ctggaacgac 60

ggccacggcg gcgtgacgta caccaatggc cccggcggcc agttctccgt caactggtcc 120

aactcgggca actttgtcgg cggcaaggga tggcagcccg gcaccaagaa caaggtcatc 180

aacttctcgg gcacctacaa ccccaacggc aacagctacc tctccgtgta cggctggtcg 240

cgcaaccccc tgatcgagta ctacatcgtc gagaactttg gcacctacaa cccgtccacc 300

ggcgccacca agctgggcga ggtgacgtcg gacggcagcg tctacgacat ctaccgcacg 360

cagcgcgtca accagccgtc catcgagggc acctccacct tttaccagta ctggtccgtc 420

cgccgcaccc accgctccag cggctccgtc aacacggcga accacttcaa cgcgtgggcc 480

tcgcacggcc tgacgctggg caccatggat taccagattg ttgccgtgga gggctacttt 540

agctctggct ctgcttctat taccgtcagc taa 573

<210> 4
<211> 732
<212> ADN
<213> *Acremonium cellulolyticus*

<400> 4

gctgaggcga tcaactacaa ccaaaactac attgctagtg gtgccaatgt tcaatactcg 60

cccaacatcg ctgcgggttc tttctccatc aactacaata cgcaggggga ctttgtggtg 120

ggacttggtt ggcaaccagg tgatgctaac cccatcacct acagcggctc cttctcggcc 180

tcgggtgttg gtatccttgc cgtgtacggc tggaccacca acccgctcgt ggaatactat 240

atcatggagg ttcacgacgg ataccagact gtcggcacac acaagggcac tgtgacgagc 300

gacggcggca cctatgatat ctgggagcac cagcaggtca atcagccgtc cattctgggc 360

acctccacct tcaaccagta catctcgatc cgccaaagcc cccggacgag cggtacggtt 420

accgtgcaga accacttcaa tgcctgggcg caggcgggct tgaatctcgg cacaatgaac 480

taccaggtcc tggcagtcga gagctggagc ggcagcggct ctggacaaat ctcgctcagc 540

aagggcactg gcggtggcac caccaccacc acacccacgg gtcccaccag cacgagcacc 600

gctccttcga gcggaggtac cggtgctgct caatggggac aatgcggagg aattggctgg 660

accggcccga ctacctgcgt gtccccttat acttgcaagt actttaacgc ttactacagt 720

cagtgccaat ag 732

<210> 5
<211> 25

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 5
gtacaccctc ggccccggcg gccag 25

<210> 6
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 6
cggggccgag ggtgtacgtc acgcc 25

<210> 7
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 7
caagaacagg gtcatcaact tctcg 25

<210> 8
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 8
gatgaccctg ttcttggtgc cgg 23

<210> 9
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 9
cgtgacgttc accctcggcc ccggc 25

<210> 10
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 10
cgagggtgaa cgtcacgccg ccgtg 25

<210> 11
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 11
ctcgggcagc tttgtcggcg gcaag 25

<210> 12
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 12
cgacaaagct gcccgagttg gaccag 26

<210> 13
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 13
catcaactac gatacgcagg gggac 25

<210> 14
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 14
ccctgcgtat cgtagttgat ggag 24

<210> 15
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 15
gatacgcaga gggactttgt ggtgg 25

<210> 16
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 16

caaagtccct ctgcgtatcg tagttg 26

<210> 17
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 17
gataccagtc tgtcggcaca cacaag 26

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 18
gccgacagac tggtatccgt cgtg 24

<210> 19
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 19
gatccgccga agcccccgga cgag 24

<210> 20
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 20
gggggcttcg gcggatcgag atgtac 26

<210> 21
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 21
caggcgggca tgaatctcgg cacaatg 27

<210> 22
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 22
ccgagattca tgcccgcctg cgccc 25

<210> 23
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 23
gcagcggcac tggacaaatc tcgctc 26

<210> 24
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 24
gatttgtcca gtgccgctgc cgctcc 26

<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 25
cacgggtcac accagcacga gcac 24

<210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 26
gtgctggtgt gacccgtggg tgtg 24

<210> 27
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 27
gtcacaccaa cacgagcacc gctcc 25

<210> 28
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 28
gtgctcgtgt tggtgtgacc cgtgg 25

<210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 29
caatgcggag aaattggctg gaccgg 26

<210> 30
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 30
ccagccaatt tctccgcatt gtcccc 26

<210> 31
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 31
ctttctccgt caactacaat acgc 24

<210> 32
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 32
gtagttgacg gagaaagaac ccg 23

<210> 33
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 33
gtcaactacg atacgcaggg ggactttg 28

<210> 34
<211> 28
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 34
ccctgcgtat cgtagttgac ggagaaag 28

<210> 35
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 35
ctccttcacg gcctcgggtc gggtg 25

<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 36
ccgaggccgt gaaggagccg ctgtag 26

<210> 37
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 37
cgcttaccac agtcagtgcc aatag 25

<210> 38
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 38
cactgactgt ggtaagcgtt aaagtac 27

<210> 39
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 39
cagtcagagc caatagggat cctc 24

<210> 40

<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 40
cctattggct ctgactgtag taagc 25

<210> 41
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 41
cgtgacgttc accaatggcc ccggc 25

<210> 42
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 42
cattggtgaa cgtcacgccg ccgtg 25

<210> 43
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 43
caacaacggc ttcttctact cgtactg 27

<210> 44
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 44
cgagtagaag aagccgttgt tgaagcc 27

<210> 45
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 45
caactttgtc tgcggcaagg gatgg 25

<210> 46
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 46
ccatcccttg ccgcagacaa agttg 25

<210> 47
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 47
ctccgtcagc acggcgaacc ac 22

<210> 48
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 48
gtggttcgcc gtgctgacgg ag 22

<210> 49
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 49
gcaactttat cggcggcaag ggatg 25

<210> 50
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 50
cttgccgccg ataaagttgc ccgag 25

<210> 51
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 51
cactgtgacg tgcgacggcg gcac 24

<210> 52
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 52
ccgccgtcgc acgtcacagt gcc 23

<210> 53
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 53
ccgtgcagtg ccacttcaat gcc 23

<210> 54
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 54
cattgaagtg gcactgcacg gtaac 25

<210> 55
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 55
gactagcccg ggtcgagttt atcattatc 29

<210> 56
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 56
gacgagagat ctccattttg tttatttatg tg 32

<210> 57
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 57
gactagagat ctatgcaact gttcaatttg cc 32

<210> 58
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 58
cagcatgagc tcagcagaaa ccagcaaag 29

<210> 59
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 59
atggtttcct tcacctccct cctcgccggc 30

<210> 60
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 60
ttagctgacg gtaatagaag cagagccaga 30

<210> 61
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 61
atgggcatct catctattct tctctctgct 30

<210> 62
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 62
ctattggcac tgactgtagt aagcgttaaa 30

<210> 63
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 63
gattaggagc tccagacgat tggtcccg 28

<210> 64
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 64
gactagggat ccttagctga cggtaatag 29

<210> 65
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 65
gattatgagc tcgctgaggc gatcaactac 30

<210> 66
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 66
gattagggat ccctattggc actgactgta g 31

<210> 67
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 67
cagacgattg gtcccggcac gggcttcaac aacggctact 40

<210> 68
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 68
cccctcgagt tagctgacgg taatagaagc agagc 35

<210> 69
<211> 35
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 69
gggaggcctg cgcatcatgg tttccttcac ctccc 35

<210> 70
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 70
gtgccgggac caatcgtctg gcgcttttca acgtccacgg 40

<210> 71
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 71
gggaggcctg cgcatcatgg tttccttcac ctccc 35

<210> 72
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido que actúa como cebador de PCR

<400> 72
ccctcgagt tagctgacgg taatagaagc agagc 35

<210> 73
<211> 117
<212> ADN
<213> *A. cellulolyticus*

<400> 73

atgggcatct catctattct tctctctgct ctgatcgcgg ggggagcctt ggctctgccc 60

gctgcagaac ctgtgtcgtt cgatatccgg gatgaaaaca tcaccctggc gcgccgc 117

<210> 74
<211> 672
<212> ADN
<213> *T. viride*

<400> 74

atggtttcct tcacctccct cctcgccggc gtcgccgcca tctccggagt cttggccgct 60

cccgctgctg aggtcgagtc cgtggacgtt gaaaagcgcc agacgattgg tcccggcacg 120

ggcttcaaca acggctactt ctactcgtac tggaacgacg gccacggcgg cgtgacgtac 180

accaatggcc ccggcggcca gttctccgtc aactggtcca actcgggcaa ctttgtcggc 240

ggcaagggat ggcagcccgg caccaagaac aaggtcatca acttctcggg cacctacaac 300

cccaacggca acagctacct ctccgtgtac ggctggtcgc gcaacccccc gatcgagtac 360

tacatcgtcg agaactttgg cacctacaac ccgtccaccg gcgccaccaa gctgggcgag 420

gtgacgtcgg acggcagcgt ctacgacatc taccgcacgc agcgcgtcaa ccagccgtcc 480

atcgagggca cctccacctt ttaccagtac tggtccgtcc gccgcaccca ccgctccagc 540

ggctccgtca acacggcgaa ccacttcaac gcgtgggcct cgcacggcct gacgctgggc 600

accatggatt accagattgt tgccgtggag ggctacttta gctctggctc tgcttctatt 660

accgtcagct aa 672

<210> 75
<211> 849
<212> ADN
<213> *A. cellulolyticus*

<400> 75

atgggcatct catctattct tctctctgct ctgatcgcgg ggggagcctt ggctctgccc 60

gctgcagaac ctgtgtcgtt cgatatccgg gatgaaaaca tcaccctggc gcgccgcgct 120

gaggcgatca actacaacca aaactacatt gctagtggtg ccaatgttca atactcgccc 180

aacatcgctg cgggttcttt ctccatcaac tacaatacgc aggggggactt tgtggtggga 240

cttggttggc aaccaggtga tgctaacccc atcacctaca gcggctcctt ctcggcctcg 300

ggtgttggta tccttgccgt gtacggctgg accaccaacc cgctcgtgga atactatatc 360

atggaggttc acgacggata ccagactgtc ggcacacaca agggcactgt gacgagcgac 420

ggcggcacct atgatatctg ggagcaccag caggtcaatc agccgtccat tctgggcacc 480

tccaccttca accagtacat ctcgatccgc caaagccccc ggacgagcgg tacggttacc 540

gtgcagaacc acttcaatgc ctgggcgcag gcgggcttga atctcggcac aatgaactac 600

caggtcctgg cagtcgagag ctggagcggc agcggctctg gacaaatctc gctcagcaag 660

ggcactggcg gtggcaccac caccaccaca cccacgggtc ccaccagcac gagcaccgct 720

ccttcgagcg gaggtaccgg tgctgctcaa tggggacaat gcggaggaat tggctggacc 780

ggcccgacta cctgcgtgtc cccttatact tgcaagtact ttaacgctta ctacagtcag 840

tgccaatag 849

REIVINDICACIONES

1. Una xilanasa mutante que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 con las siguientes sustituciones de restos de aminoácido:

el resto de asparagina en la posición 29 está sustituido con leucina;
el resto de lisina en la posición 58 está sustituido con arginina;
el resto de tirosina en la posición 27 está sustituido con fenilalanina; y
el resto de asparagina en la posición 44 está sustituido con serina;
y opcionalmente que comprende de 1 a 10 sustituciones de restos de aminoácido adicionales en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;

en donde dicha xilanasa mutante es una xilanasa termoestable y proporciona una velocidad inicial de reacción que es al menos un 70 % de la proporcionada por la SEQ ID NO: 1 y que tiene una actividad xilanasa después del tratamiento con calor a 50 °C durante 24 horas que es al menos un 50 % de su actividad xilanasa antes del tratamiento con calor.

2. Un método de producción de un producto sacarificado de lignocelulosa, comprendiendo el método poner en contacto una materia prima lignocelulósica, tal como pasta, con la xilanasa termoestable de la reivindicación 1.

3. El método de producción de un producto sacarificado de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende, además:

recuperar la xilanasa termoestable de una solución de reacción de sacarificación que contiene el producto sacarificado de lignocelulosa obtenido por el contacto de la materia prima lignocelulósica con una xilanasa termoestable; y
poner en contacto la xilanasa termoestable recuperada con una materia prima lignocelulósica para producir un producto sacarificado.

4. El método de producción de un producto sacarificado de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la solución de reacción de sacarificación se somete a separación de sólido-líquido usando centrifugación y una membrana de microfiltración, y el líquido separado se ultrafiltra usando una membrana de ultrafiltración para separar y recuperar el producto sacarificado de lignocelulosa y la xilanasa termoestable, y opcionalmente el método comprende poner en contacto un sólido obtenido por la separación de sólido-líquido usando centrifugación o una membrana de microfiltración y la xilanasa termoestable recuperada usando la membrana de ultrafiltración con una materia prima lignocelulósica para producir un producto sacarificado.

5. Un ácido nucleico representado por una secuencia de bases que codifica la secuencia de aminoácidos de la xilanasa mutante de acuerdo con la reivindicación 1.

6. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5.

7. Un transformante que comprende el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Un transformante de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el transformante es una célula derivada de *Escherichia coli, Bacillus subtilis,* levadura, un actinomiceto o un hongo filamentoso.

9. Un transformante de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el hongo filamentoso pertenece al género *Trichoderma,* al género *Acremonium,* al género *Humicola* o al género *Aspergillus.*

10. Un método de producción de una xilanasa mutante, comprendiendo el método cultivar el transformante de acuerdo con las reivindicaciones 7 a 9 y recuperar la xilanasa mutante de al menos uno del transformante cultivado o un producto de cultivo del transformante.

11. Un método de blanqueo de una pasta, comprendiendo el método poner en contacto con la pasta la xilanasa mutante de acuerdo con la reivindicación 1.

12. Un producto que comprende la xilanasa mutante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el producto es un detergente, un pienso para animales o un modificador para la fabricación de pan.