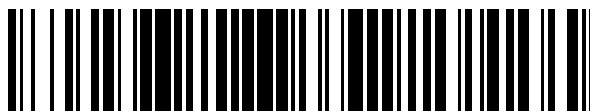


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 408**

51 Int. Cl.:
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
D21H 17/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05714675 .5**
96 Fecha de presentación: **24.03.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1727903**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.12.2006**

54 Título: **Xilanasas modificadas que exhiben expresión mejorada**

30 Prioridad:
25.03.2004 US 556061 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.03.2012

73 Titular/es:
**IOGEN BIO-PRODUCTS CORPORATION
310 HUNT CLUB ROAD EAST
OTTAWA, ON K1V 1C1, CA**

72 Inventor/es:
**WHITE, Theresa;
GIROUX, Genevieve, R. y
WALLACE, Katie, E., A.**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 377 408 T3

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

DESCRIPCIÓN

Xilanasas Modificadas que Exhiben Expresión Mejorada

La presente invención se relaciona con xilanasas con expresión mejorada, más particularmente con la expresión mejorada y la secreción de xilanasas de un anfitrión.

5 Antecedentes de la invención

Las xilanasas, producidas por muchas especies de hongos filamentosos y bacterias, son un grupo de enzimas con amplia utilidad comercial. Una aplicación principal de las xilanasas es para bioblanquear la pulpa en la producción de papel. Adicionalmente, se han utilizado xilanasas como agentes clarificantes en jugos y vinos, como agentes enzimáticos en el lavado o dispositivos y semiconductores y también se pueden utilizar para mejorar la digestibilidad de alimento para cerdos y aves.

La mayor parte de la xilanasas explotadas para aplicaciones industriales son miembros de la Familia 11, que muestran diversidad en sus propósitos bioquímicos y biofísicos. Por ejemplo, se han aislado xilanasas termoestables de las bacterias (US 6,667,170), hongos (US 6,635,464), u otros termófilos extremos (Lüthi et al. 1990; Winterhalter et al. 1995; Simpson et al. 1991). Alternativamente se ha optimizado el desempeño de la xilanasas para diversas aplicaciones industriales por medio de la ingeniería de la proteína (por ejemplo U.S. 5,759,840; U.S. 5,866,408; U.S. 5,405,769; y Turumen et al., 2001).

La implementación exitosa de las enzimas de xilanasas en las aplicaciones industriales requiere producción económica a partir de un microbio anfitrión, que secreta la xilanasas en el caldo de cultivo durante fermentación por inmersión. Esto es particularmente necesario para la producción a gran escala de las xilanasas desde termófilos o termófilos extremos que son difíciles de cultivar o que no secretan niveles de proteína suficientemente altos. Típicamente, el microbio anfitrión para la producción de enzimas industriales es un hongo filamentosos tal como *Trichoderma*, *Aspergillus* o *Fusarium*, un actinomicete tal como *Streptomyces* o una especie de bacteria *Bacillus*. Esto significa que los genes que codifican una xilanasas objetivo, si se aíslan de un organismo diferente o de la proteína, la construcción por ingeniería del gen xilanasas del organismo anfitrión, se puede clonar en la producción del anfitrión en tal forma que el gen se liga operablemente a las secuencias de ADN que facilitará su expresión y secreción del anfitrión.

La expresión y secreción de las proteínas exógenas mediante modificación genética de las cepas industriales de *T. reesei* ha permanecido como un reto significativo durante muchos años (Conesa et al., 2001). La expresión de las proteínas heterólogas en *T. reesei* provoca una respuesta de Proteína No plegada (UPR; Saloheimo et al., 1999), que resulta de una acumulación de los polipéptidos nacientes no plegados o plegados en forma incorrecta en el lumen del retículo endoplásmico (ER). Debido a la información limitada actualmente disponible sobre los mecanismos que regulan el plegamiento y la secreción de las xilanasas de la Familia 11 de *T. reesei*, se han implementado diversas estrategias para facilitar la expresión de alto nivel de las xilanasas exógenas relacionadas en la cepas anfitrionas *T. reesei*. Estas incluye el uso de promotores altamente inducibles, tales como aquellas de los genes celulasa *T. reesei*, y reemplazo de los genes de celulosa naturales con construcciones de expresión de xilamasas que contienen promotores altamente inducibles.

La expresión de las xilanasas bacterianas de *T. reesei* puede requerir la fusión de la xilanasas a un portador de polipéptido *T. reesei* con una estructura de dominio intacto, tal como el núcleo catalítico o los dominios de unión de las proteínas mannanasa I *T. reesei* o CBH II (Paloheimo, et al., 2003). Esta estrategia, sola o en combinación con la eliminación de uno o más genes de celulasa de la cepa anfitriona *T. reesei*, se describe en la US 6,635,464 y US 6,667,170 para dirigir la expresión de las xilanasas de la Familia 11 termófila de expresión de fuentes bacterianas (*A. flexuosa*) y fúngicas (*C. thermophilus*). Aunque el polipéptido portador aumenta ciertamente la producción y la secreción de las xilanasas heterólogas descritas en la US 6,635,464 y US 6,667,170 de las cepas anfitrionas *T. reesei*, no siempre es deseable tener un polipéptido portador unido a la enzima de xilanasas para aplicaciones industriales. En estos casos, el polipéptido portador necesitaría ser retirado mediante proteólisis posterior al periodo de la proteína de fusión en el caldo de cultivo y antes de su uso en la aplicación. Sin embargo la proteólisis agrega tiempo y costes para la producción general de la xilanasas objetivo debido a los costes y tiempo de incubación requeridos para la etapa de proteólisis en sí misma así como también como la pérdida de rendimiento potencial de la xilanasas objetivo durante la remoción proteolítica del polipéptido portador.

Esta estrategia para utilizar una fusión de una proteína objetivo a una proteína portadora natural a la célula anfitriona que también se ha empleado exitosamente para aumentar la producción y la secreción de quimosina de mamífero de *Aspergillus* (Van den Brink et al., WO 02/36752 y WO 03/106484). La WO 03/106484 describe mejoras adicionales en la producción y la secreción de las proteínas de fusión de glucoamilasa-quimosina de *Aspergillus* mediante la introducción de un motivo de N-glicosilación dentro del polipéptido ligador artificial entre los patrones de fusión de quimosina y glucoamilasa o dentro de la secuencia de péptido quimosina. Sin embargo, no existe

demostración de los beneficios de la producción de quimosina de *Aspergillus* por medio de la introducción de un motivo de glucosilación en una construcción que no contiene un socio de fusión.

5 Sagt et al. (2000) reporta mejoras en la secreción de una proteína objetivo de un anfitrión eucariótico heterólogo por medio de la introducción de un motivo de N-glucosilación dentro de la proteína objetivo. En este informe, la introducción de un sitio de N-glucosilación dentro de la secuencia de un mutante hidrófobo de una cutinasa fúngica o de los fragmentos de anticuerpo naturales que resulta en la secreción aumentada de la proteína objetivo de un anfitrión de levadura *Saccharomyces* o *Pichia*. Sin embargo, la introducción del sitio de glucosilación en la cutinasa fúngica natural no resulta en ningún aumento en la expresión de los anfitriones de levadura heterólogos.

10 La WO 02/02597 reporta la producción de la subunidad FSH-alfa y los polipéptidos glucocerebrosidasa que contienen un sitio de glucosilación. La meta de estos estudios es mejorar la estabilidad y la expresión de estos polipéptidos. Sin embargo, la aplicabilidad del método solo se demuestra utilizando la adición de las secuencias de nucleótido cortas que codifican el motivo de N'-glucosilación por medio de la modificación directa de la secuencia de péptido principal.

Es un objeto de la presente invención proporcionar xilanasas modificadas que exhiben expresión mejorada.

15 Resumen de la invención

La presente invención se relaciona con xilanasas con expresión mejorada, más particularmente con la expresión mejorada y la secreción de xilanasas de un anfitrión.

20 La presente descripción proporciona una xilanasas de la Familia 11 modificada que comprende, una secuencia que introduce un sitio de N-glucosilación consensus funcional que no se encuentra de otra forma en la xilanasas de la Familia 11 de la que se deriva la xilanasas de la Familia 11 modificada. La xilanasas de la Familia 11 modificada puede comprender una sustitución de un aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste de la posición 34 (X34N), posición 131 (X131N), posición 180 (X180N), posición 182 (X182N), y una combinación de las mismas, en una asparagina, la posición se determina de la alineación de secuencia de la xilanasas de la Familia 11 con la secuencia de aminoácidos de la xilanasas II *Trichoderma reesei* como se define en la SEQ ID NO:1. La presente invención también pertenece a una xilanasas de la Familia 11 modificada como se describió anteriormente, y que comprende adicionalmente, una sustitución de un aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste de posición 36 (X34N-S36T), posición 182 (X180NS182T), posición 184 (X182N-S184T), y una combinación de las mismas, con una treonina. Preferiblemente, la xilanasas de la Familia 11 modificada comprende una mutación X131N. También se proporciona una xilanasas de la Familia 11 modificada seleccionada del grupo que consiste de: ITX1, ITX2, ITX3, ITX3', ITX4, ITX4', ITX5, ITX5', Xln1-131N, y *S. lividans* xlnC-131N.

25 La presente descripción está dirigida a una xilanasas de la Familia 11 modificada como se describió anteriormente, en donde la xilanasas modificada cuando se expresa en una cepa anfitriona *Trichoderma* exhibe un aumento en la eficiencia de la expresión de por lo menos 40% cuando se compara con la eficiencia de la expresión de una xilanasas de la Familia 11 de la cual se deriva la xilanasas modificada.

35 La presente descripción también proporciona una xilanasas modificada de la construcción génica de la Familia 11 que comprende un promotor ligado operativamente a una señal de secreción que se liga operativamente a una región codificante, la región codificante que comprende un sitio de N-glucosilación consensus funcional que no se encuentra de otra forma en la xilanasas de la Familia 11 de la que se deriva la xilanasas de la Familia 11 modificada, la construcción génica de xilanasas modificada resulta en un aumento en la eficiencia de la expresión de una xilanasas codificada modificada cuando se compara con la eficiencia de la expresión de una xilanasas codificada de la Familia 11 de la cual se deriva la xilanasas modificada codificada.

40 Adicionalmente, se proporciona un microbio genéticamente modificado que comprende la construcción génica de xilanasas de la Familia 11 modificada como ya se describió. Preferiblemente, el microbio genéticamente modificado comprende un miembro del género de *Trichoderma* o *Hypocrea*. Adicionalmente, el microbio genéticamente modificado comprende una señal de secreción que es una señal de secreción *Trichoderma*, por ejemplo una señal de secreción xilanasas *Trichoderma*.

45 La presente descripción también pertenece a un microbio genéticamente modificado que comprende una región codificante que codifica una xilanasas modificada seleccionada del grupo que consiste de: ITX1, ITX2, ITX3, ITX3', ITX4, ITX4', ITX5, ITX5', Xln1-131N, y *S. lividans* xlnC-131N.

50 La presente descripción proporciona un método para procesar alimento o comida que comprende, tratar el alimento o comida con un aditivo que comprende la xilanasas de la Familia 11 modificada que comprende, una secuencia que introduce un sitio de N-glucosilación consensus funcional que no se encuentra de otra forma en la xilanasas de la Familia 11 de la que se deriva la xilanasas de la Familia 11 modificada. Por ejemplo el aditivo de alimento o comida

se puede seleccionar del grupo que consiste de un aditivo para alimento de aves, un aditivo para alimento de cerdos, un aditivo alimenticio utilizado en panadería o un aditivo alimenticio utilizado en cerveza.

La presente descripción también pertenece a un método para fabricación de pulpa de papel que comprende tratar la pulpa con una xilanasa de la Familia 11 modificada que comprende, una secuencia que introduce un sitio de N-glucosilación consensus funcional que no se encuentra de otra forma en la xilanasa de la Familia 11 de la que se deriva la xilanasa de la Familia 11 modificada.

La presente descripción pertenece a un uso de una xilanasa modificada que comprende, una secuencia que introduce un sitio de N-glucosilación consensus funcional que no se encuentra de otra forma en la xilanasa de la Familia 11 de la que se deriva la xilanasa de la Familia 11 modificada, es un proceso industrial o de alimento o comida. El proceso industrial puede ser fabricación de pulpa de papel.

La presente descripción proporciona la xilanasa modificada de la Familia 11 con expresión mejorada y secreción de un anfitrión *Trichoderma* sin cambio evidente en las propiedades bioquímicas de la enzima. Los resultados aumentan en la producción específica de xilanasa y la productividad general de la proteína de la cepa facilita la fabricación económica de los productos de xilanasa de la Familia 11 para aplicaciones industriales. Adicionalmente, en las realizaciones de la invención, se pueden introducir sitios de N-glucosilación en regiones de homología de secuencia conservada al inicio, mitad del final de la secuencia de péptido de la Familia 11. Esto se logra sin ningún efecto adverso en la función de la xilanasa.

Este resumen de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características de la invención llegarán a ser más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos en donde:

La FIGURA 1 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de xilanasa de la Familia 11 con numeración del terminal N, en donde Bp - *Bacillus pumilus* (SEQ ID NO:31); Ca - *Clostridium acetobutylicum* P262 xynB (SEQ ID NO:33); Cs - *Clostridium stercorarium* xynA (SEQ ID NO:34); Rf - *Ruminococcus flavefaciens* (SEQ ID NO:35); Tr2 - *Trichoderma reesei* xyn2 (SEQ ID NO: 1); Tv - *Trichoderma viride* (SEQ ID NO:42); Th - *Trichoderma harzianum* (SEQ ID NO:41); Sc - *Schizophyllum commune* xynA (SEQ ID NO:36); An - *Aspergillus niger*, var. *awamori* (SEQ ID NO:43); Ak- *Aspergillus kawachii* xynC (SEQ ID NO:44); At \square *A spergillus tubingensis* (SEQ ID NO:29); Tr1 \square *Trichoderma reesei* xynI (SEQ ID NO:2); An *Aspergillus awamari* var, *kawachi* xyn B (SEQ ID NO:28); Fs - *Fibrobacter succinegenes* xyn II (SEQ ID NO: 44); Ss- *Streptomyces* sp 36a (SEQ ID NO: 37); SIB- *Streptomyces lividans* xynB (SEQ ID NO:38); SIC - *Streptomyces lividans* xyn C (SEQ ID NO-39); Ti - *Thermomyces lanuginosus* xyn (SEQ ID NO:45); Tf - *Thermomonospora fusca* TfxA (SEQ ID NO:40), Bc - *Bacillus circulans* (SEQ ID NO:30); Bs - *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:32).

La FIGURA 2 muestra un mapa del vector pC/XHML-TV utilizado para dirigir la expresión de una xilanasa modificada en *T. reesei*.

La FIGURA 3 muestra un mapa del vector de mutagenia general pALT-H(I)TXn, en donde "n" es un descriptor, por ejemplo "13" o "18", y el vector puede comprender una mutación 131 N (es decir, pALT-ITXn), o el vector puede comprender una mutación 131N (es decir, pALT-HTXn). Por ejemplo cuando "n" es 18, y el vector no comprende la mutación 131N, el vector es pALT-HTX18.

La FIGURA 4 muestra un mapa del vector general pc/xH(I)TXn-TV utilizado para dirigir la expresión de las xilanasas modificadas en *T. reesei*, en donde "n" es el descriptor, por ejemplo "13", "18", "18(R135Y)", o "1(M131Q)" y el vector puede comprender una mutación 131 N (es decir, pc/xITXn-TV), o el vector no puede comprender una mutación 131N (es decir, pc/xHTXn- TV). Por ejemplo cuando "n" es 18, y el vector no comprende la mutación 131N, el vector es pc/XITXn-TV.

La FIGURA 5 muestra mapas de los vectores utilizados para dirigir la expresión de *T. reesei* xilanasa I y *S. lividans* xilanasa C natural (y modificado), respectivamente, en *T. reesei*. La FIGURA 5A: pc/xXYN1-(T118N)-TV: La FIGURA 5B: pc/xXYLC-(T128N)-TV.

La FIGURA 6 muestra los perfiles de actividad de pH para la xilanasa modificada ITX1, y su contraparte natural HEX18.

La FIGURA 7 muestra el perfil de actividad de temperatura para la xilanasa modificada ITX1 y su contraparte natural HTX18.

Descripción de la realización preferida

La presente invención se relaciona con xilanasas con expresión mejorada más particularmente CON la expresión y secreción mejoradas de xilanasas de un anfitrión.

5 La siguiente descripción es de una realización preferida. Las xilanasas y xilanasas modificadas, como se bosqueja aquí, se pueden utilizar para los propósitos de blanquear la pulpa de papel u otras aplicaciones que requieren actividades típicamente en temperaturas y pH por encima de aquel de la enzima tipo natural. Para el bioblanqueamiento de la pulpa, la xilanasa preferida se deriva de una xilanasa clasificada en la Familia 11 (ver Tabla 1).

10 Las Xilanasas se producen mediante muchas especies de hongos filamentosos y bacterias, y se pueden clasificar en dos familias, la Familia 10 o 11, basada principalmente en la estructura y similitudes mecánicas (Henrissat, 1991). Las enzimas de la xilanasas de la Familia 11 son un grupo de enzimas pequeñas de masa molecular relativamente baja (aproximadamente 20 kDa, y aproximadamente residuos de 200 amino ácido).

15 Las xilanasas de la Familia 11 secretadas por *T. reesei* no se glucosilan, lo que es consistente con la ausencia de un motivo de N-glucosilación consensus en la secuencia de aminoácidos de xilanasas I (Törrönen et al., 1992) Sin embargo, la xilanasas II tampoco se glucosila, a pesar de la presencia de los motivos de N-glucosilación consensus en su secuencia. En contraste, las celulasas *T. reesei* son N-glucosiladas en los residuos de asparagina dentro del motivo consensus Asn-Xaa-Ser/Thr, en donde Xaa es cualquier aminoácido diferente a prolina (o N-X-S/T, en donde X es cualquier aminoácido diferente a prolina). Sin embargo, no se glucosilan todos los sitios potenciales dentro de las diversas enzimas de celulasas (Hui et al., 2001 y 2002). Esto sugiere que el organismo *Trichoderma* no reconoce algunos motivos consensus en las secuencias de aminoácido naturales.

La presente descripción proporciona una xilanasas modificada de la Familia 11 que comprende una secuencia o motivo de glucosilación, por ejemplo, pero no limitado a Asn-Xaa-Ser/Thr, Asn-Xas-Thr, o Asn-Xaa-Ser, que no está presente de otra forma en la xilanasas correspondiente de la cual se prepara o se deriva la xilanasas modificada.

25 Adicionalmente, la presente descripción proporciona una xilanasas de la Familia 11 modificada que tiene uno más de un aminoácido seleccionado de las posiciones 34, 131, 180 y 182 sustituidas por una asparagina (Asn o N) en donde la posición se determina de la alineación de secuencia de la xilanasas de la Familia 11 con Xilanasas II de *Trichoderma reesei* de la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 1. Se puede describir tal sustitución como: X34N, X131N, X180N o X182N, en donde el aminoácido "X" se sustituye por asparagina o "N" en la posición indicada. Por ejemplo en X131N, indica que el aminoácido "X" en la posición 131 (como se determina de la alineación de secuencia de la xilanasas de la Familia 11 con *Trichoderma reesei* xilanasas II (TrX II) de la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ ID NO: 1) se sustituye por asparagina o "N". Preferiblemente, la mutación está en la posición 131, que produce X131N, o su posición correspondiente en otra xilanasas de la Familia 11 como se determina por la alineación de secuencia con TrX II (SEQ ID NO: 1). Se ha observado que la xilanasas modificada comprende una o más de una de estas mutaciones, por ejemplo, la sustitución X131N, exhibe una eficiencia mejorada de la expresión comparado con la xilanasas de la Familia 11 de la cual se produce o se deriva la xilanasas modificada. Ejemplos de las construcciones que comprenden las mutaciones X34N, X131N, X180N o X182N incluyen ITX5 y ITX5', ITX1 y ITX2, ITX3 y ITX3', y ITX4 y ITX4', respectivamente.

40 También se pueden introducir mutaciones adicionales por ejemplo, X34N-S36T, X180N-S182T, y X182N-S 184T en la xilanasas de la Familia 11 para producir la secuencia consensus Asn-Xas-Thr, por lo cual se asegura que el Thr se posiciona hacia arriba del Asn dentro de la xilanasas. Ejemplos de construcciones que comprenden las mutaciones X34N, S36T; X180N, S182T; o X182N, S184T incluyen ITX5' ITX3', y ITX4', respectivamente.

45 La xilanasas modificada se puede modificar de cualquier xilanasas de la Familia 11, por ejemplo una xilanasas que es natural para *Trichoderma*, que incluye pero no se limita a *T. reesei* xilanasas II, *T. reesei* xilanasas I, *Trichoderma viride* xilanasas, o una xilanasas de *Aspergillus*, *Fusarium*, como actinomicete tal como *Streptomyces* por ejemplo, pero no limitado a, xilanasas B *Streptomyces lividans* y xilanasas C *Streptomyces lividans*, o una xilanasas de *Bacillus*, *Thermobifida*, *Actinomadura*, *Chaetomium*, o *Thermatoga*.

50 La modificación de *T. reesei* xilanasas I (TrX I) para introducir una mutación equivalente en las posiciones 131, como se determina mediante comparación con la secuencia de *T. reesei* xilanasas II (TrX-II; SEQ ID NO: 1), requiere una mutación en la posición 118 de TrX-I (es decir la mutación T118N). En este caso *T. reesei* xilanasas I, con una sustitución en T118N, comprende una función equivalente a aquella de X131N como se encuentra en TrX II (ver FIGURA 1 para las alineaciones de "Tr1" y "Tr2"). De forma similar, la modificación de *S. lividans* Xilanasas C, para introducir una mutación equivalente en aquella posición 131, como se determina mediante comparación con la secuencia de TrX-II, requiere una mutación en la posición 128 de *S. lividans* xilanasas C (es decir la mutación T128N). En este caso xilanasas T128N en *S. lividans* xilanasas C comprende una mutación equivalente a aquella de X131N en TrX-II (ver FIGURA 1 para las alineaciones de "SIC" y "Tr2").

El término "xilanasas", significa una enzima que hidroliza xilano a xilosa. Las xilanasas pueden poseer diversas propiedades, que incluyen la estructura (peso molecular, orientación tridimensional, composición de aminoácido, y sitio activo) y actividad catalítica (índice y cinéticas de la hidrólisis de xilano, y la capacidad de actuar en otros sustratos) como lo sabe el experto en la técnica.

5 La xilanasas modificadas se pueden derivar de una xilanasas tipo natural, nativa, o se pueden derivar de una xilanasas ya alterada que se ha mutagenizado y seleccionado o construido genéticamente por ingeniería utilizando protocolos estándar como lo sabría una persona experta en la técnica, por ejemplo la mutagenia dirigida a sitio, mutagenia química, o métodos equivalentes, para alterar su perfil de pH, perfil de temperatura, especificidad de sustrato, o una combinación de los mismos. Ejemplos de tales xilanasas alteradas incluyen aquellas descritas aquí, por ejemplo
 10 pero no limitado a HTX18 y HTX18-R135Y. Ejemplos adicionales de xilanasas alteradas, o construidas por ingeniería genéticamente, que también se pueden modificar adicionalmente como se describe aquí, incluyen aquellos que se conocen por una persona experta en la técnica, por ejemplo pero no limitado, a aquellas descritas en la WO 00/29587, WO 01/92487 y WO 03/046169, e incluyen, pero no se limitan a, TrX-DS1; TrX-162H-DS1; TrX-162H-DS2; TrX-162H-DS4; TrX-162H-DS8; TrX-75A; TrX-HML-105H; TrX-HML-75A-105H; TrX-HML-75C-105R; TrX-HML-75G-105R; TrX-HML-75G-105R-125A-129E; TrX-HML-75G-105H-125A-129E; TrX-HML-75A-105H-125A-129E; TrX-HML-75A-105R-125A-129E; TrX-157D-161R-162H-165H; TrX-HML-AHAE; TrX-HML-AHAE-R; TrX-HML-AHAE-RR; TrX-HML-AHAE-RRR; TrX-HML-AHA-RR-DRHH; TrX-HML-AHAE-RR-DRHH; TrX-HML-AHAE-RRR-DRHH; TrX-116G; TrX-118C; TrX-HMLAHCAE-R; TrX-H-11D-ML-AHGAE-RR; TrX-HML-AHGAE-R; TrX-H-11D-ML-AHGCAE-RR; TrX-H-11D-ML-AHCAERR.

20 Una xilanasas natural o xilanasas tipo natural es una xilanasas que no se ha modificado o alterado por fuera del curso regular de la naturaleza. Una xilanasas natural puede comprender mutaciones que ocurren en forma natural.

"Xilasa II de alineación de secuencia *Trichoderma reesei*" o "numeración TrX" significa la numeración asociada con la posición de los aminoácidos basados en la secuencia de aminoácidos de la xilanasas II *Trichoderma reesei* (también denominado como TrX II; ver Tabla 1, Tr2; FIGURA 1; y la SEQ ID NO: 1). El TrX II es un miembro de la
 25 xilanasas de la Familia 11. La xilanasas de la Familia 11 exhibe un grado sustancial de similitud de secuencia (ver FIGURA 1), por lo tanto, al alinear los aminoácidos para optimizar la similitud de secuencia entre las enzimas de xilanasas y al utilizar la numeración de aminoácido de TrX II (Xilasa II de *Trichoderma reesei*) como la base para numeración, las posiciones de aminoácidos dentro de otras enzimas xilanasas se pueden determinar con relación a TrX II.

30 Los estudios estructurales indican que la xilanasas de la Familia 11 de orígenes fúngicos y bacterianos presentan la misma estructura molecular general (por ejemplo U.S. 5,485,769), que exhibe tres tipos o la estructura secundaria: láminas beta, vueltas y una única hélice alfa. Una xilanasas se puede clasificar como una "xilanasas de la Familia 11" si esta comprende de forma similar otras xilanasas de la Familia 11, en particular dos residuos de ácido glutámico en las posiciones 86 y 177 (con base en la numeración de aminoácido de la Xilasa II de *Trichoderma reesei* (TrX II))
 35 que pueden servir como residuos catalíticos. Las xilanasas de la Familia 11 pueden incluir aquellas mencionadas en la Tabla 1. Preferiblemente, la xilanasas es una Xilasa II de *Trichoderma reesei*, *Trichoderma reesei* xilanasas 1, *Trichoderma viride* xilanasas, *Streptomyces lividans* xilanasas B, *Streptomyces lividans* xilanasas C, o una xilanasas de *Aspergillus*, *Fusarium*, o *Bacillus*.

TABLA 1. Enzimas de xilanasas de la familia 11 representativas de bacterias y hongos

Microbio	Xilanasa	SEQ ID NO:	Prot Suizo No
<i>Aspergillus niger</i>	Xyn A	SEQ ID NO:43	-
<i>Aspergillus awamori var kawachi</i>	Xyn B	SEQ ID NO:28	P48824
<i>Aspergillus kawachii</i>	Xyn C	SEQ ID NO:44	-
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Xyn A	SEQ ID NO:29	-
<i>Bacillus circulans</i>	Xyn A	SEQ ID NO:30	P09850
<i>Bacillus pumilus</i>	Xyn A	SEQ ID NO:31	P00694
<i>Bacillus subtilis</i>	Xyn A	SEQ ID NO:32	P18429
<i>Cellulomonas fimi</i>	Xyn D	-	P54865
<i>Chainia spp</i>	Xyn	-	-
<i>Clastridium acetobutylicum</i>	Xyn B	SEQ ID NO:33	
<i>Clastridium stercorarium</i>	Xyn A2	SEQ ID NO:34	P33558
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Xyn II	SEQ ID NO:45	-
<i>Neocallimasterix patriciarum</i>	Xyn A	-	P29127
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	Xyn II	-	-
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Xyn A	SEQ ID NO:35	P29126
<i>Schizophyllum commune</i>	Xyn A	SEQ ID NO:36	P35809
<i>Streptomyces sp. No. 36a</i>	Xyn	SEQ ID NO:37	
<i>Streptomyces lividans</i>	Xyn B	SEQ ID NO:38	P26515
<i>Streptomyces lividans</i>	Xyn C	SEQ ID NO:39	P26220
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	Xyn II	-	-
<i>Thermomonospora fusca</i>	Xyn A	SEQ ID NO:40	-
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xyn A	SEQ ID NO:46	O43097
<i>Trichoderma harziaman</i>	Xyn	SEQ ID NO:41	P48793
<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn I	SEQ ID NO:2	P36218
<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn II	SEQ ID NO: 1	P36217
<i>Trichoderma viride</i>	Xyn	SEQ ID NO:42	-

5 Una xilanasa modificada es cualquier xilanasa que se construye por ingeniería para introducir o comprender un sitio de glucosilación cambiado cuando se compara con la xilanasa de la cual se prepara o se deriva la xilanasa modificada.

10 Ejemplos no limitantes de tales modificaciones incluyen X34N, X34N-S36T, X131N, X180N, X180N-S182T, X182N, o X182N-S184T (numeración TrX), o una combinación de los mismos. Preferiblemente, la xilanasa modificada es una xilanasa de la Familia 11. La xilanasa modificada puede comprender las enzimas I o II de xilanasa *Trichoderma reesei*, o las enzimas de xilanasa B o C de *Streptomyces lividans*. Se reconoce de manera general que la secuencia de aminoácidos de una xilanasa natural que puede ser dirigida para alterar sus propiedades bioquímicas o biofísicas. Un ejemplo de una xilanasa modificada comprende la mutación X131N, o su equivalente como se determina al comparar la alineación de secuencia de la xilanasa de interés con aquella de TrX II (SEQ ID NO: 1) y otras modificaciones, sustituciones o eliminaciones con relación a la xilanasa natural correspondiente. Diversos ejemplos de xilanasas modificadas que no se consideran limitantes se muestran en la Tabla 2.

15 La sustitución en la posición 131 a asparagina, en conjunto con un Thr/Ser en la posición 133, que es altamente conservada en las xilanasas de la Familia 11, resulta en la creación de un motivo de N-glucosilación: Asn-Xaa-

Thr/Ser. Se ha observado que las xilanasas que comprenden la mutación 131N resultan en una producción aumentada de xilanasas. Sin estar limitado por la teoría, la introducción del motivo de N-glucosilación puede resultar en una eficiencia aumentada de la expresión, degradación reducida, secreción aumentada, o una combinación de los mismos, de la xilanasas modificada cuando se compara con la enzima de xilanasas natural que carece de la modificación 131N. La xilanasas modificada puede exhibir expresión mejorada de una cepa anfitriona *Trichoderma* y exhibe propiedades bioquímicas o biofísicas similares, en comparación con la xilanasas natural correspondiente de la Familia 11. También se pueden preparar mutaciones similares en otros sitios adyacentes a Thr/Ser conservado en la xilanasas, por ejemplo pero no limitado a X34N, X180N y X182N (ITX 2, ITX 3 y ITX 4, respectivamente; ver Tabla 2), para producir la secuencia Asn-Xaa-Thr/Ser. En cada una de estas ubicaciones el aminoácido Ser se conserva, y el modelamiento 3-D de la proteína plegada indica que estos sitios se posicionarán en la superficie externa de la proteína. Las modificaciones adicionales que se pueden hacer incluyen X34N-S36T, X180N-S182T o X182N-S184T (ITX5', ITX3' y ITX4', respectivamente) para producir el motivo de glucosilación Asn-Xaa-Thr.

Aquellos expertos en la técnica son conscientes que las sustituciones de aminoácido se pueden hacer mediante un número de métodos, por ejemplo mutagenia aleatoria o dirigida al sitio para alterar la secuencia de péptido principal de la xilanasas para producir un motivo de N-glucosilación consenso. Cualquier método adecuado se puede utilizar para introducir la mutación X34N, X131N, X180N, X182N, X34N-S36T, X180N-S182T o X182N-S184T en el gen xilanasas de la familia. Por ejemplo, los motivos de N-glucosilación, se pueden introducir mediante sustitución directa de uno o más codones dentro de la secuencia de xilanasas principal a diferencia de la adición de los nucleótidos extra que codifican el motivo de N-glucosilación con el fin de aumentar la producción de la xilanasas del anfitrión sin cambiar las propiedades biofísicas y bioquímicas de la enzima.

Sustitución directa significa que el sitio de glucosilación se presenta al introducir cambios de nucleótido específicos dentro de la región que codifica la xilanasas que altera la secuencia de péptido principal sin cambiar su longitud a través de la adición o eliminación de uno o más aminoácidos.

Como se muestra en el Ejemplo 11, y con referencia a las Figuras 5 y 6, la xilanasas ITX1, que comprende la mutación T131N y que tiene de otra forma mutaciones similares como HTX18 (ver Tabla 2; ITX1 que carece de la mutación Y135R), tiene un pH similar y perfil de actividad de temperatura como la xilanasas HTX18. Así la adición de la mutación T131N no altera las propiedades biofísicas o bioquímicas de la xilanasas. Adicionalmente, como se muestra en las Tablas 3 y 4 de los Ejemplos 9 y 10, respectivamente, se produce la enzima ITX1 con un aumento en la eficiencia de la expresión de aproximadamente 73%-100% cuando se compara con HTX18 o HTX18(R135Y).

TABLA 2: Ejemplos de Xilanasas modificadas

Xilanasas	Descripción
TrX-HML	TrX con N10H, Y27M, y N29L (ver U.S. 5,759,840)
HTX13	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E
HTX18	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H y T165H
ITX1	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E, T131N, H144R, N157D, Q161R, Q162H y T165H
ITX2	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E, T131N, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H y T165H
ITX3	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165H y F180N
ITX3'	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165H, F180N y S182T
ITX4	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165H y S182N
ITX4'	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165H, S182N y S184T
ITX5	TrX con N10H, Y27M, N29L, Q34N, S75A, L105H, S125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H y T165H
ITX5'	TrX con N10H, Y27M, N29L, Q34N, S36T, S75A, L105H, S125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H and T165H
HTX18-R135Y	TrX con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, S125A, I123E, H144R, N157D, Q161R, Q162H y T165H
XlnI(131N)	<i>T. reesei</i> xylanase I con la mutación T118N
<i>S. lividans</i> xlnC(131N)	<i>S. lividans</i> xylanase C con la mutación T128N

"La eficiencia de la expresión" es la cantidad de enzima activa, o actividad enzimática, producida por un anfitrión de producción. Se puede calcular la eficiencia de la expresión como la cantidad de enzima activa o actividad enzimática generada por volumen unitario del cultivo de fermentación cuando todas las condiciones de fermentación permanecen constantes. Se considerará primero la xilanasa por tener mayor eficiencia de la expresión comparado con la segunda xilanasa si se produce la primera xilanasa en niveles que sean mayores que una segunda xilanasa mediante el mismo anfitrión en las mismas condiciones de fermentación. Por ejemplo si se produce la primera xilanasa en una cantidad que es mayor de aproximadamente 40 % a aproximadamente 2500 %, o como la cantidad entre, la segunda xilanasa por el mismo anfitrión en las mismas condiciones de fermentación, entonces la eficiencia de la expresión de la primera xilanasa es mayor que la segunda xilanasa. Por ejemplo, se puede producir la primera xilanasa en una cantidad que es mayor que 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, o 2500 %, o una cantidad que existe entre, la segunda xilanasa por el mismo anfitrión en las mismas condiciones de fermentación. Preferiblemente, se produce la primera xilanasa en una cantidad que es por lo menos 50% mayor que la segunda xilanasa por el mismo anfitrión en las mismas condiciones de fermentación (ver Ejemplos 9 y 10).

"Ligado operativamente" significa que las secuencias particulares interactúan directamente o indirectamente para llevar a cabo una función pretendida, tal como mediación o modulación de la expresión de gen. La interacción de las secuencias ligadas operativamente, por ejemplo, se puede mediar por las proteínas que interactúan con las secuencias ligadas operativamente.

"Gen xilanasa" significa una región de ADN que incluye la secuencia que codifica la enzima de Xilanasa. El gen de xilanasa puede codificar una xilanasa modificada o natural. Una xilanasa comprende adicionalmente un promotor, la señal de secreción, la región codificante y el terminador transcripcional.

Una "construcción génica de xilanasa" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que comprende los elementos necesarios para producir y secretar una xilanasa nativa, o una xilanasa modificada. Preferiblemente, la construcción génica de xilanasa se optimiza para permitir la expresión de un anfitrión de producción adecuado, por ejemplo pero no limitado a, la producción de un anfitrión *Trichoderma*. Estos elementos incluyen:

A. Región codificante xilanasa.

Una región codificante de xilanasa comprende la secuencia de ADN necesaria para codificar la xilanasa funcional como se aísla de los filtrados de cultivo extracelular. La región que codifica la xilanasa puede comprender la secuencia que codifica una xilanasa natural, una secuencia que codifica una xilanasa alterada que se ha construido por ingeniería previamente, una xilanasa modificada como se describe aquí, y una combinación de las mismas. La región codificante de la xilanasa modificada puede incluir la mutación X34N, X131N, X180N, X182N, X34NS36T, X180N-S182T o X182N-S184T (numeración TrX II); pero no incluye una señal de secreción en el extremo de terminal amino. La región codificante de xilanasa puede ser de un gen de xilanasa de la Familia 11 que se ha alterado previamente (ver ejemplos no limitantes proporcionados anteriormente, por ejemplo pero no limitado a aquellos descritos en la WO 00/29587, WO 01/92487 y WO 03/046169;) o puede ser una xilanasa natural de la Familia 11, por ejemplo de un *Trichoderma* o *streptomyces* gene. Por ejemplo, pero no se considera limitante, la región codificante de xilanasa modificada se puede derivar de una región codificante construida por ingeniería o natural de *T. reesei xln1*, *T. reesei xln2*, o *S. lividans xlnC*.

Como lo entiende un experto en la técnica, una región codificante natural se puede alterar o construir por ingeniería mediante reemplazo, sustitución, adición, o eliminación de uno o más ácidos nucleicos sin cambiar su función (es decir actividad de xilanasa).

Una señal de secreción.

Una "señal de secreción" es una secuencia de péptido presente dentro de la proteína secretada, típicamente en el terminal amino de una proteína secretada, que dirige la entrada de la proteína en el retículo endoplásmico (ER); la señal de secreción se puede dividir posteriormente de la proteína secretada madura mediante una peptidasa de señal.

La región codificante de un gen de xilanasa modificada se puede ligar en forma operativa a una secuencia de ADN que codifica cualquier señal de secreción (es decir, ligado en una forma que se puede dirigir la secuencia transcrita al ER) que es funcional en un anfitrión de producción deseado, por ejemplo, pero no limitado a, *Trichoderma*. La señal de secreción xilanasa, por ejemplo, puede ser de cualquier proteína secretada *Trichoderma*, por ejemplo de una xilanasa *Trichoderma*, o de otra proteína bacteriana o fúngica. Sin querer ser limitante, la señal de secreción puede ser del gen de xilanasa *Trichoderma reesei* (*xln1*) o el gen xilanasa II (*xln2*).

Aquellos expertos en la técnica son consientes que una señal de secreción natural se puede modificar mediante reemplazo, sustitución, adición, o eliminación de uno o más ácidos nucleicos sin cambiar su función como una señal de secreción.

Un promotor.

- 5 Se prefiere que el promotor es funcional en el anfitrión de producción. El promotor se liga en forma operativa a la región codificante del gen de xilanasa modificada, o este se liga operativamente a la señal de secreción que se liga operativamente a la región codificante del gen de xilanasa modificada, ya que el promotor controla la expresión de la región codificante, o la señal de secreción y la región codificante, respectivamente. Sin esperar estar limitado en ninguna forma, los promotores preferidos que se pueden utilizar en la práctica incluyen los promotores *Trichoderma* cbh1, cbh2, eg1, eg2, eg3, eg5, xln1 y xln2, o una combinación de dos o más de dos de estos promotores.
- 10

Aquellos expertos en la técnica están consientes que se puede modificar un promotor natural mediante reemplazo, sustitución, adición, o eliminación de uno o más ácidos nucleicos sin cambiar su función como un promotor.

Secuencias adicionales entre la región codificante de xilasa madura de la señal de secreción.

- 15 La construcción génica de xilanasa puede contener las secuencias adicionales que codifican los aminoácidos adicionales entre la señal de secreción y la región codificante de xilanasa, o la región codificante de xilanasa modificada como se describe aquí. Estas secuencias, que pueden ser naturales o sintéticas, pueden codificar uno o más de los aminoácidos de la proteína madura que corresponde a la señal de secreción codificada por la construcción o puede resultar de la adición de los sitios de enzima de restricción necesarios para unir las secuencias que codifican la señal de secreción y la región que codifica la xilanasa modificada.

- 20 Otros elementos.

- La construcción génica de xilanasa puede contener un terminador transcripcional que es funcional en el anfitrión de producción, como lo sabría un experto en la técnica. El terminador transcripcional se puede posicionar inmediatamente en la dirección 3' de la región codificante de xilanasa. Un ejemplo de un terminador transcripcional que no se considera limita en ninguna forma, comprende 1.9 kb de 3' de ADN en el codón de parada del gen *Trichoderma* cbh2, como se describe en los Ejemplos 5.1-5.4.
- 25

La construcción génica de xilanasa puede contener un marcador seleccionable para determinar la transformación del anfitrión de producción. El marcador seleccionable puede estar presente en el mismo vector de plásmido en la dirección 3' o la dirección 5' de la técnica de la construcción génica en el extremo 5' o 3' de la construcción), o el marcador seleccionable se puede co-transformar con la construcción en un vector de plásmido separado.

- 30 Las elecciones de los marcadores seleccionables son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica e incluyen genes (sintéticos o naturales) que confieren a las células transformadas la capacidad de utilizar un metabolito que no se metaboliza normalmente por el microbio (por ejemplo, el gen *A. nidulans* amdS que codifica la acetamidasa y confiere la capacidad de crecer en acetamida como la fuente única de nitrógeno) o resistencia antibiótica (por ejemplo, el gen *Escherichia coli* hph que codifica higromicina-β-fosfotransferasa y confiere resistencia a la higromicina). Si la cepa anfitriona carece de un gen funcional para el marcador seleccionado ya que el gen se puede utilizar como un marcador. Ejemplos de tales marcadores incluyen trp, pyr4, pyrG, argB, leu, y similares. La cepa anfitriona correspondiente por lo tanto habrá carecido de un gen funcional que corresponde al marcador seleccionado, es decir que carece en la expresión de trp, pyr, arg, leu y similares. Un ejemplo no limitante de un marcador seleccionable utilizado en las construcciones genéticas se describe en el Ejemplo 5.1. En este ejemplo, el marcador seleccionable es un gen *E. coli* hph expresado utilizando el promotor de quinasa fosfoglicerato *Trichoderma* (pgk). Se describe un marcador seleccionable alterno en el Ejemplo 5.2 y Comprende la *Neurospora crassa* pyr4 que se expresa desde su promotor natural.
- 35
- 40

- La presente descripción proporciona construcciones genéticas y anfitriones de producción genéticamente modificados, por ejemplo las cepas *Trichoderma*, que expresan xilanasas modificadas que introducen o alteran un sitio de glucosilación en xilanasa. Ejemplos no limitantes de las xilanasas modificadas que comprenden un sitio de glucosilación introducido incluyen una o más de una de la mutación X34N, X131N, X180N, X182N, X34N-S36T, X180M-S182T o X182N-S184T (numeración TrX II).
- 45

- La construcción génica de xilanasa modificada no se limita por el método para elaborar la construcción que puede incluir, pero no se limita a técnicas de biología molecular estándar tal como el aislamiento del ADN de plásmido de *E. coli* mediante lisis alcalina, digestión del ADN de plásmido con endonucleasas de restricción, separación y aislamiento de los fragmentos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, el ligado de los fragmentos de ADN con ligasa de ADN T4, inserción de los sitios de restricción únicos en los extremos de los fragmentos de ADN mediante la reacción de la cadena de polimerasa o la adición de ligadores de oligonucleótidos, y las interferencias
- 50

de ADN. Los fragmentos con la polimerasa de ADN T4 o el fragmento Klenow de la polimerasa I de ADN E. coli. Tal procedimiento se describe en los Ejemplos 1-5.

5 En un aspecto adicional de la construcción génica de xilanasas modificadas se introduce en y se expresa en un anfitrión microbiano deseado (producción). Preferiblemente se aumenta la eficiencia de la expresión para, las xilanasas modificadas del microbio recombinante resultante. Por ejemplo la eficiencia de expresión puede ser por lo menos 40% o más, mayor que la eficiencia de la expresión para la xilanasas de la Familia 11 correspondiente producido de la construcción génica correspondiente de la cual se deriva o se produce la xilanasas modificadas, el mismo anfitrión de microbio crece bajo condiciones de fermentación similares. Por ejemplo, se puede producir la primer xilanasas en una cantidad que es mayor que 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 425, 450, 474, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1250, 1300, 1500, 1750, 2000, 2250, o 2500%, o cualquier cantidad entre estas, la segunda xilanasas por el mismo anfitrión en las mismas condiciones de fermentación. Preferiblemente, se produce la primera xilanasas en una cantidad que es por lo menos 50% más que la segunda xilanasas mediante el mismo anfitrión en las mismas condiciones de fermentación (ver Ejemplos 9 y 10).

15 Los métodos para introducir la construcción de ADN en un anfitrión de producción son familiares para aquellos expertos en la técnica incluyen, pero no se limitan a tratamiento con cloruro de calcio de células bacterianas o protoplastos fúngicos para debilitar las membranas celulares, la adición de polietilenglicol permite la fusión de las membranas celulares, la despolarización de las membranas celulares mediante electroporación, o "shooting" de ADN a través de la pared celular y las membranas por medio de bombardeo de microproyectil con una pistola de partículas.

25 El anfitrión de producción puede ser un miembro de las especies de *Trichoderma* (que se ha clasificado en diversos tiempos como *T. virida*, *T. longibrachiatum* y, más recientemente, como *Hypocrea jecorina*-Simmons, 1977; Bissett, 1984; Cannon 1986; Kuhls et al., 1996). Estas especies son bien adecuadas debido a que producen las xilanasas de la Familia 11. Adicionalmente, se han publicado métodos para la introducción de construcciones de ADN en cepas que producen celulosa de *Trichoderma* (Lorito et t., 1993; Goldman et al., 1990; Penttila et al., 1987).

El Ejemplo 7.1 describe un procedimiento para introducir una construcción génica de xilanasas en esporas *Trichoderma* utilizando una pistola de partículas. El Ejemplo 7.2 describe un procedimiento para introducir una construcción génica de xilanasas en protoplastos de *Trichoderma* tratados con polietilenglicol y cloruro de calcio.

30 Un aumento en la eficiencia de la expresión, por ejemplo una mejora de 50% de la eficiencia de la expresión, sobre una xilanasas natural de la Familia 11, refleja una mejora significativa que está por encima de la variabilidad natural de la cepa y es comercialmente significativa. Los resultados muestran que el grado de mejora de la producción de xilanasas mediante este método puede ser tan alto como 2 veces y puede alcanzar cerca de 10 veces. La medición del grado de mejoramiento de la producción de xilanasas es mediante el crecimiento del cultivo y la medición de la actividad de xilanasas, como se describe en el Ejemplo 8.

35 Se entiende por aquellos expertos en la técnica que la actividad de xilanasas específica de una mezcla de enzima (en IU/mg de proteína) puede aumentar al reducir la cantidad de celulosa y otras proteínas en la mezcla de enzima. Esto se puede hacer como se desea, mediante separación física y mecánica de la mezcla de enzima para retirar la celulosa y otras proteínas de la mezcla, o mediante la eliminación de la celulosa u otros genes mediante medios recombinantes del anfitrión de producción ya que la expresión de la celulosa u otras proteínas se reduce o se elimina. Tales métodos tienen poco o ningún efecto en la producción real de xilanasas mediante el anfitrión de producción.

45 Las xilanasas y las xilanasas modificadas, como se bosqueja aquí, se pueden utilizar para los propósitos de blanquear la pulpa u otras aplicaciones que requieren actividades en temperaturas y pH por encima de aquel de la enzima tipo natural. Para el bio-blanqueamiento de la pulpa, se utiliza más comúnmente una xilanasas derivada de la xilanasas clasificada en la Familia 11 (ver Tabla 1). Las modificaciones como se bosqueja aquí se pueden encontrar en las proteínas de xilanasas natural, y estas enzimas de xilanasas natural, cuando se expresa en refuerzos de producción alternos (no naturales), puede exhibir las características deseadas como se describe aquí, y se incluyen dentro de la presente invención.

50 Los usos industriales de una xilanasas producida de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, procesos de alimentos, por ejemplo aditivos para alimento para cerdos o aves, panadería o bebidas, o procesos industriales tales como fabricación de pulpa y papel.

El siguiente es un resumen de las secuencias descritas (SEQ ID NO: 28 a 45 se refiere a las xilanasas de los organismos mencionados (ver Tabla 2 para más detalles):

Secuencia	Nombre	Secuencia	Nombre
SEQ ID NO:1	TrxII (Tr ₂)	SEQ ID NO:25	S182N,S184T
SEQ ID NO:2	TrxI (Tr ₁)	SEQ ID NO:16	Q34N
SEQ ID NO:3	S75A	SEQ ID NO:27	Q34N,536T
SEQ ID NO:4	L105H	SEQ ID NO:28	<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>kawachi</i>
SEQ ID NO:5	S125A	SEQ ID NO:29	<i>Aspergillus tubigenis</i>
SEQ ID NO:6	I129E	SEQ ID NO:30	<i>Bacillus circulans</i>
SEQ ID NO:7	Y135R	SEQ ID NO:31	<i>Bacillus painthus</i>
SEQ ID NO:8	H144R	SEQ ID NO:32	<i>Bacillus subtilis</i>
SEQ ID NO:9	N157D	SEQ ID NO:33	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
SEQ ID NO:10	Q161R	SEQ ID NO:34	<i>Clostridium stercorearium</i>
SEQ ID NO:11	Q162H	SEQ ID NO:35	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>
SEQ ID NO:12	T165H	SEQ ID NO:36	<i>Schizophyllum commune</i>
SEQ ID NO:13	T131N,R133Y	SEQ ID NO:37	<i>Streptomyces</i> sp. No. 36a
SEQ ID NO:14	R135Y	SEQ ID NO:38	<i>Streptomyces lividans</i> Xyn B
SEQ ID NO:15	T128N	SEQ ID NO:39	<i>Streptomyces lividans</i> Xyn C
SEQ ID NO:16	XynC-5F (Nhe)	SEQ ID NO:40	<i>Thermamonospora fusca</i>
SEQ ID NO: 17	XyaC-3R (Kpm)	SEQ ID NO:41	<i>Trichoderma harzianum</i>
SEQ ID NO:18	T118N	SEQ ID NO:42	<i>Trichoderma viride</i>
SEQ ID NO:19	Xyn1-F	SEQ ID NO:43	<i>Aspergillus niger</i>
SEQ ID NO:20	Xyn1-R (BamHI)	SEQ ID NO:44	<i>Aspergillus kawachii</i> Xyn C
SEQ ID NO:21	T131N	SEQ ID NO:45	<i>Fibrobacter succinogenes</i>
SEQ ID NO:22	F180N	SEQ ID NO:46	<i>Thermomyces lanuginatus</i>
SEQ ID NO:23	F180N,S182T	SEQ ID NO:47	modified <i>T. reesei</i> xylanase I (T131N)
SEQ ID NO:24	S182N	SEQ ID NO:48	modified <i>S. lividans</i> xylanase C (T131N)

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

El Ejemplo 1 describe el aislamiento del ADN genómico de la cepa *Trichoderma reesei* M2C38 y los derivados genéticamente modificados de estas cepas. Los Ejemplos 2-5 describen la construcción de las colecciones de ADN genómicas, la clonación de diversos genes, la modificación de las secuencias de gen de xilanasas y diversas construcciones genéticas para la expresión de las xilanasas modificadas de las cepas *Trichoderma reesei* RutC30 y M2C38. Los Ejemplos 7-10 describen la transformación y expresión de las construcciones genéticas de xilanasas en las cepas *Trichoderma reesei* RutC30 y M2C38. Los Ejemplos 11 y 12 describen la caracterización bioquímica de las xilanasas modificadas y naturales.

Ejemplo 1: Aislamiento del ADN genómico *Trichoderma reesei* y la Construcción de las Colecciones Genómicas *T. reesei*

La cepa *Trichoderma reesei* M2C38 es una cepa propietaria de logen Corporation derivada de *Trichoderma reesei* RutC30 (ATCC #56765; Montenecourt and Eveleigh, 1979), que a su vez se deriva de *Trichoderma reesei* Qm6A (ATCC # 13631; Mandels and Reese, 1957). Es bien sabido por aquellos expertos en la técnica que los procedimientos descritos aquí, las construcciones genéticas de estas cepas, y la expresión de las construcciones genéticas en estas cepas es aplicable a todas las cepas *Trichoderma* derivadas de Qm6A.

Para aislar el ADN genómico, se inocula 50 mL de Caldo de Cultivo de Dextrosa de Papa (Difco) con esporas *T. reesei* recolectadas de una placa Agar de Dextrosa de Papa con un bucle de inoculación estéril. Los cultivos se agitan a 200 rpm durante 2-3 días a 28° C. El micelo se filtra en un filtro de microfibras de vidrio GFA (Whatman) y se lava con agua desionizada fría. Las tortas fúngicas se congelan en nitrógeno líquido molido en un polvo con un mortero y pestillo precongelado; se resuspenden 0.5 g de biomasa en polvo en 5 mL de 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.5 más 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS). El lisato se centrifuga (5000 x g durante 20 min, 4° C) a los residuos celulares de los glóbulos. El sobrenadante se extrae con 1 regulador de volumen (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) de fenol saturado seguido por extracción con 1 volumen de regulador saturado de fenol: cloroformo: alcohol isoamilo (25:2.4:1) con el fin de retirar las proteínas solubles. El ADN se precipita de la solución al agregar 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de 95% de etanol frío. Después de incubarlo durante por lo menos 1 h a 20° C, el ADN se sedimenta mediante centrifugación 5000 x g durante 20 min, 4° C, se enjuaga con 10 mL de 70 % de etanol, se seca al aire y se resuspende en 1 mL 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0. El ARN se digiere mediante la adición de Ribonucleasa A (Boehringer Mannheim) se agrega en una concentración final de 0.1 mg/mL y se incuba a 37° C durante 1 hora. Las extracciones secuenciales con 1 volumen de fenol saturado con

regulador y 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamilo saturado con regulador (25:24:1) se utilizan para retirar la ribonucleasa de la solución de ADN. El ADN de nuevo se precipita con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de 95 % de etanol frío, sedimentado mediante centrifugación, se enjuaga con 70% de etanol, se seca al aire y se resuspende en 50 μ L de 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0. Se determina la concentración de ADN al medir la absorbancia de la solución a 260 nm (p. C1 en Sambrook et al., 1989).

Se construyen dos colecciones de plásmido y una colección de fago utilizando ADN genómico aislado de la cepa T. reesei M2C38. Se construyen colecciones de plásmido en el vector pUC119 (Viera and Messing, 1987) como sigue: 10 μ g de ADN genómico se digiere durante 20 hrs a 37° C en un volumen de 100 μ L con 2 unidades/ μ g de las enzimas de restricción HindIII, BamHI o EcoRI. Se fracciona el ADN digerido en un serie de 0.75% de gel de agarosa en 0.04M Tris-acetato, 1 mM EDTA y se tiñen con bromuro de etidio. Las piezas de gel corresponden a los tamaños de los genes de interés (con base, en la información publicada y Southern blots) se cortan y se someten a electro-elución para recuperar los fragmentos de ADN (Sambrook et al., pp. 6.28-6.29). Estas fracciones enriquecidas de ADN se ligan en pUC119 con el fin de crear colecciones de gen en reacciones de ligación que contienen 20-50 μ g/ml de ADN en una relación molar de 2:1 del vector: ADN de inserto, 1 mM ATP y 5 unidades de la ligasa de ADN T4 en un volumen total de 10-15 μ L a 4° C durante 16 h. Se electropora la cepa de Escherichia coli HB101 con las reacciones de ligación utilizando el Sistema Porator de Célula (Gibco/BRL) siguiendo el protocolo del fabricante y los transformantes seleccionados en agar LB que contiene 70 μ g/ml de simplicilina.

Se construye la colección de fago en el vector lambda λ DASH (Stratagene, Inc.) como sigue: se digiere el ADN genómico (3 μ g) con 2, 1, 0.5 y 0.2 unidades/ μ g de BamHI durante 1 hora a 37° C para generar los fragmentos 9-23 kB en tamaño. El ADN de cada digestión se purifica mediante extracción con 1 volumen de Tris-fenol saturado: cloroformo: alcohol isoamilo (25: 24:1) seguido por precipitación con 10 μ L de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 250 μ L de 95 % de etanol (-20° C). El ADN digerido se sedimenta mediante microcentrifugación, se enjuaga con 0.5 ml de 70 % de etanol frío, se seca al aire y se resuspende en 10 μ L de agua desionizada estéril. El enriquecimiento de los fragmentos de ADN 9-23 kB en tamaño se confirma mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8 % de agarosa en 0.04 M Tris-acetato, 1 mM EDTA). Se liga el ADN digerido (0.4 μ g) en 1 μ g brazos de λ DASH predigeridos con BamHI (Stratagene) en una reacción que contiene 2 unidades de ligasa de ADN T4 y 1 mM ATP en un volumen total de 5 μ L a 4° C durante la noche. La mezcla de ligación se empaca en partículas de fago utilizando los extractos de empaque GigaPack® II Gold (Stratagene) siguiendo el protocolo del fabricante. La colección se titula utilizando la cepa anfitriona E. coli XL1-Blue MRA (P2) y se encuentra que contiene 3 x 10⁵ clones independientes.

30 **Ejemplo 2:** Aislamiento de clones genómicos de colecciones T. reesei M2C38

2.1 Clonación de los genes celobiohidrolasa I (cbh1) y celobiohidrolasa II (cbh2) de las colecciones pUC119

Se identifican los transformantes E. coli HB101 cosechando los clones cbh1 o cbh2 de las colecciones recombinantes pUC119- BamHI o - EcoRI mediante hibridación con levantamiento de colonia: se transfectan 1-3 x 10⁴ colonias en las membranas de nylon HyBond™ (Amersham); las membranas se ponen con las colonias hacia arriba en papel de transferencia (VWR 238) saturado con 0.5 M NaOH, 1 M NaCl durante 5 min para lisar las células bacterianas y desnaturalizar el ADN; las membranas luego se neutralizan al colocarlas con las colonias hacia arriba en papel de transferencia (VWR 238) saturado con 1.5 M Tris, pH 7.5 más 1 M NaCl durante 5 min; las membranas se dejan secar al aire durante 30 min y el ADN luego se fija a las membranas al hornear a 80° C durante 2h.

Se preparan sondas marcadas con ³²P mediante amplificación de PCR de fragmentos cortos (0.7-1.5 kB) de las regiones codificantes cbh1 y cbh2 del grupo enriquecido de los fragmentos BamHI o EcoRI, respectivamente, en una reacción de marca que contiene 10-50 ng del ADN objetivo, 0.2 mM de cada d(GCT)TP, 0.5 PM dATP, 20-40 PCi α -³²P-dATP, 10 pmol de cebadores de olionucleótido y 0.5 unidades de la polimerasa de Etiqueta en un volumen total de 20 μ L. La reacción se somete a 6-7 ciclos de amplificación (95° C, 2 mm; 56° C, 1.5 min; 70° C, 5 min). Se precipita el ADN marcado con ³²P amplificado mediante la adición 0.5 mL de 10% (p/v) de ácido tricloroacético y 0.5 mg de tARN de levadura. El ADN se sedimenta mediante microcentrifugación, se lava dos veces con 1 mL de 70 % de etanol, se seca al aire y se resuspende en 1M Tris pH7.5, 1 mM EDTA.

Las membranas de nylon en las que se han fijado los plásmidos recombinantes pUC119 se prehibridan en bolsas selladas al calor durante 1h a 60-65° C en 1 M NaCl, 1% de SDS, 50 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.5 con 100 mL de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado. Se realizan hibridaciones en bolsas selladas al calor en el mismo regulador con solo 50 μ g/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado y 5 x 10⁶ - 5 x 10⁷ cpm de la sonda desnaturalizada bgII, cbh1 o cbh2 durante 16-20 h a 60-65° C. Se lavan las membranas una vez durante 15 min con 1 M NaCl, 0,5% de SDS a 60° C, dos veces durante 15 min cada uno con 0.3M NaCl, 0.5 % de SDS a 60° C y una vez durante 15 min con 0.03M NaCl, 0.5% de SDS a 55° C. Las Membranas se ponen de nuevo en bolsas selladas por calor y se exponen a película de rayos X Kodak RP 16-48 h a -70° C. La película de rayos X se realiza siguiendo los protocolos del fabricante. Se añaden colonias que dan señales fuertes o débiles y se cultivan en medio 2xYT complementado con 70 μ g/ml de ampicilina. El ADN de plásmido se aísla de estos cultivos utilizando el método de lisis alcalina (Sambrook, et al., pp. 1.25-1.28) y se analiza mediante la digestión de restricción, hibridación Southern (Sambrook, et al., pp. 9.38-9.44) y análisis PCR (Sambrook, et al., pp. 14,18-14,19).

Los clones que llevan el gen *cbh1* se identifican mediante hibridación con levantamiento de colonia de la colección pUC119-BamHI con una sonda 0.7 kb *cbh1* preparada utilizando los cebadores de oligonucleótido diseñados para amplificar bp 597-1361 de la secuencia publicada *cbh1* (Shoemaker et al., 1983). Un clon *cbh1*, se aísla pCOR132 que contiene un fragmento 5,7 kb BamHI que corresponde al promotor (4.7 kb) y 1 kb del gen estructural *cbh1* (2.3 kb). A partir de esto, un fragmento 2.5 kb EcoRI que contiene el promotor *cbh1* (2.1 kb) y el extremo 5' de la región codificante *cbh1* (0.40 kb) se subclona en pUC119 para generar pCB152. Los clones que llevan el gen *cbh2* se identifican mediante hibridación con levantamiento de colonia de la colección pUC119-EcoRI con una sonda 1.5 kb *cbh2* preparada utilizando los cebadores de oligonucleótido diseñados para amplificar bp 580-2114 de la secuencia publicada *cbh2* (Chen et al. 1987). Se aísla un clon *cbh2*, pZUK600 que contiene un fragmento 4.8 kb EcoRI que corresponde al promotor (600 bp), el gen estructural (2.3 kb) y terminador (1.9 kb).

2.1 Clonación del gen de xilanas II terminador *cbh1* (*xln2*), y el promotor de quinasa fosfoglicerato (*pgk*) de las colecciones de XDASH

Se preparan sondas marcadas con digoxigenina 11-dUTP de regiones codificantes amplificadas PCR de los genes *cbh1*, *xln2* y *pgk* mediante marcado de cebador aleatorio utilizando el equipo de Detección y Marca de DIG (Boehringer Mannheim) y siguiendo los protocolos del fabricante. Los clones genómicos que contienen los genes *cbh1*, *xln2* y *pgk* se identifican mediante hibridación con levantamiento de placa de la colección λ DASH. Para cada gen de interés, se transfieren 1×10^4 clones a membranas de nylon Nytran® (Schleicher and Schull). Las partículas de fago se lisan y el ADN de fago se desnaturaliza al poner las membranas con la placa hacia arriba en papel de transferencia (VWR238) saturadas con 0.5 M NaOH, 1 M NaCl durante 5 min; las membranas luego se neutralizan al colocar la placa hacia arriba en papel de transferencia saturado con 1.5 M Tris, pH 7.5 más 1 M NaCl durante 5 min; las membranas se dejan secar al aire durante 30 min y el ADN luego se fija a las membranas al hornear a 80° C durante 2 h. Las membranas se prehibridan en bolsas selladas por calor en una solución de 6X SSPE, 5X de Denhardt, 1% de SDS más 100 μ g/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado a 65° C durante 2 h. Las membranas luego se hibridan en bolsas selladas por calor en la misma solución que contiene 50 μ g/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado y 0.5 μ g de sondas marcadas con digoxigenina-dUTP a 65° C durante la noche. Las membranas se lavan dos veces durante 15 min en 2X SSPE, 0.1% de SDS a temperatura ambiente, dos veces durante 15 min en 0.2XSSPE, 0.1% de SDS a 65° C y una vez durante 5 min en 2X SSPE. Se identifican clones positivamente hibridados mediante reacción con un conjugado del anticuerpo de anti-digoxigenina/fosfatasa alcalina, 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato y cloruro de 4-nitro tetrazolio azul (Boehringer Mannheim) siguiendo el protocolo del fabricante. Los clones positivamente hibridados se purifican adicionalmente mediante una segunda ronda de detección con sondas marcadas con digoxigenina-dUTP.

Se aíslan clones individuales y el ADN de fago se purifica como se describe en Sambrook et al (1989) pp. 2.118-2.121 con la excepción que la etapa de gradiente CsCl se reemplaza mediante extracción con 1 volumen de fenolcoroformo: alcohol isoamilo (25: 24: 1) y 1 volumen de alcohol cloroformisoamilo (24 : 1). El ADN se precipita con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de 95 % de etanol frío. El ADN de fago precipitado se lava con 0.5 ml de 70 % de etanol frío, se seca al aire y se resuspende en 50 μ L de 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0. Los fragmentos de restricción que contienen los genes de interés se identifican mediante digestiones de restricción del ADN de fago purificado e hibridación Southern blot (Sambrook, et al., pp. 9.38-9.44) utilizando las mismas sondas marcadas con digoxigenina UTP utilizadas para detectar la colección de λ DASH. Las membranas se hibridan y los fragmentos se hibridan positivamente visualizadas por los mismos métodos utilizados para el levantamiento de placa. Una vez los fragmentos de restricción deseados de cada clon λ DASH se identifican, se repiten las digestiones de restricción, los fragmentos se resuelven en 0.8 % de gel de agarosa en TAE y se cortan las bandas deseadas. El ADN se eluye de las piezas de gel utilizando el Equipo Sephaglas BandPrep (Farmacia) siguiendo el protocolo del fabricante.

Los clones que llevan el gen *cbh1* se identifican mediante hibridación con levantamiento de colonia de la colección λ DASH (Ejemplo 2) con una sonda *cbh1* que comprende bp 45-2220 de la secuencia publicada *cbh1* (Shoemaker et al.). Un fragmento 1.8 kb BamHI que contiene el extremo 3' de la región codificante *cbh1* (0.5 kb) y el terminador *cbb1* (1.3 kb) se aísla mediante digestión de restricción de ADN de fago purificado de un clon λ DASH *cbh1*. Este fragmento se subclona en el sitio BamHI del vector de plásmido *E. coli* pUC119 para generar el plásmido pCB1Ta. Los clones que llevan el gen *xln2* se identifican mediante hibridación con levantamiento de colonia de la colección λ DASH (Ejemplo 2) con una sonda *xln2* que comprende bp 100-783 de la secuencia publicada *xln2* (Saarelainen et al., 1993). Un fragmento 5.7 kb Kpn1 que contiene el promotor (2.3 kb), regiones codificantes (0.8 kb) y el gen *xln2* terminador (2.6 kb) se aísla mediante digestión de restricción del ADN de fago purificado de un clon λ DASH *xln2*. Este fragmento se subclona en el sitio Kpn1 de pUC119 para generar el plásmido pXYN2K-2. Los clones que llevan el gen *pgk* se identifican mediante hibridación con levantamiento de colonia de la colección λ DASH (Ejemplo 2) con una sonda *pgk1* que comprende la secuencia *pgk* publicada bp 4-1596 (Vanhanen et al., 1989). Un fragmento 5.0 kb EcoRI que contiene el promotor (2.9 kb), la región codificante (1.6 kb) y el gen *pgk* terminador (0.5 kb) se aísla mediante la digestión de restricción del ADN de fago purificado de un clon λ DASH *pgk*. Este fragmento se subclona en el sitio EcoRI de pUC119 para generar el plásmido pCK5.0.

Ejemplo 3: Clonación y modificación de los genes de xilanasas 1 *T. reesei* y xilanasas C *S. lividans*

Se amplifica la xilanasas C (xylC; SEQ ID NO: 39) del ADN genómico aislado de *Streptomyces lividans* (Cepa IAF911-A.8, Kébir et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1491 (2000) 177-184) utilizando cebadores que introducen un sitio NheI en la dirección 5' y un sitio KpnI en la dirección 3' de la secuencia codificante. Se utiliza el PCR megacebador para introducir la mutación T128N en xylC. Se utiliza el cebador mutagénico en conjunto con el cebador inverso para introducir un sitio KpnI en la dirección 3'. El producto PCR resultante se aísla y se utiliza como un cebador inverso en conjunto con el cebador delantero para introducir un sitio NheI en la dirección 5'. La secuencia de la xilanasas C modificada *S. lividans* se muestra en la SEQ ID NO: 48). Las secuencias cebadoras se mencionan adelante:

T128N: CCCTCCGTCG AACCCAACAA GACCTTCCAG (SEQ ID NO: 15)
 XynC-5F(Nbe): CCCCACCCCTACCACCATCACC (SEQ ID NO: 16)
 XynC-3R(Kpn): CGTCCACCGGTACCAGGTCA ACC (SEQ ID NO: 17)

El gen que codifica la xilanasas I (xynI; SEQ ID NO: 2) se amplifica del ADN genómico aislado de la cepa *T. reesei* M2C38 utilizando los cebadores que se introducen en un sitio NheI en la dirección 5' y un sitio BamHI en la dirección 3' de la secuencia codificante. Se utiliza PCR megacebador para introducir la mutación T118N en xynI. Se utiliza el cebador mutagénico en conjunto con el cebador inverso para introducir un sitio BamHI en la dirección 3'. El producto PCR resultante se aísla y se utiliza como un cebador inverso en conjunto con el cebador delantero para introducir un sitio NheI en la dirección 5'. La secuencia del T128N modificado se muestra en la SEQ. ID NO: 47. Las secuencias cebadoras se mencionan adelante:

T118N: CCATCCAGGG CAACGCGACC TTC (SEQ ID NO: 18)
 XynI.F: CGTCGTGCTA GCATCAACTA CGAC (SEQ ID NO: 19)
 XynI-R (BamHI): GGATCCTAGT TGCTGACAC (SEQ ID NO: 20)

Las secuencias de aminoácido para la xilanasas C *T. reesei* Xilanasas I y *S. lividans* nativa no modificada codificadas por las construcciones genéticas descritas en los Ejemplos 5.4 y 5.5 se proporcionan como en la SEQ ID NO: 2 y la SEQ ID NO: 39, respectivamente.

Ejemplo 4: Mutagenia de xilanasas II *T. reesei* para generar las variantes HTX18, ITX1-5, ITX3'-5', HTX18 (R135Y)

4.1 Introducción de las mutaciones N10H, Y27M, N29L;

La ingeniería genética del gen xln2 de la cepa M2C38 se realiza mediante mutagenia de casete de un gen sintético xln2 (Sung et al., 1995; también ver la WO 01/92487 y la WO 03/046169;). Específicamente, un fragmento Apal/PinAI de hebra doble que comprende los codones 8-33, en el que los codones 10, 27 y 29 se alteran como se indica en la SEQ ID: 2, se sintetiza in vitro. Este fragmento luego se utiliza para reemplazar la secuencia xln2 natural en el pUC/XIn de plásmido (Sung et al., 1993). El ADN sintético que comprende los codones 32-190 en pUC/XLN se reemplaza por el fragmento genómico correspondiente de *T. reesei*. xln2, que contiene un intrón 108 bp en el codón. 58, que se amplifica utilizando ADN *T. reesei* genómico como una plantilla e introducir un sitio único PinAI en los codones 31 y 32 y un BamHI único directamente en la dirección 3' del codón de parada TAG. Esto genera pUC/HTX4.

4.2 Introducción de las mutaciones 75A, 105H, 125A, 129E:

Un fragmento 3.2 kb SctI que contiene las regiones de promotor, el gen xln2, y parte del terminador cbh2 se aísla de pC/XHML-TV (ver ejemplo 5.1, adelante) y se clona en el sitio SstI en el poliligador del vector de mutagenia, pALTER®-1 (Promega). Se realizan cuatro rondas secuenciales para alterar aminoácidos específicos utilizando cebadores específicamente diseñados para incorporar las mutaciones deseadas:

S75A: AGCTACCTCG CCGTGTACGG (SEQ ID NO:3),
 L105H: CCACCAAGCA OGGCCAGGT (SEQ ID NO:4),
 S125A: ACGCAGCGCC TCAACGCCC GTCCATCATC GGC (SEQ ID NO:5), y
 I129E: AACGCCCOGT CCATCGAGGG CAGCCACC TTT (SEQ ID NO:6),

(ver WO 01/92487, y WO 03/046169; para los métodos asociados); esto genera el plásmido pALT-HTX13 (el plásmido mostrado en su forma genérica, "pALT-H(I)TXn" en la FIGURA 3. La incorporación de todas las mutaciones se verifica mediante análisis de secuencia de ADN.

4.3 Introducción de la mutación Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H y T165H

- 5 Se realizan cuatro rondas secuenciales en el plásmido pALT-HTX13 utilizando el Sistema de Mutagenia in vitro Promega Altered Sites® II para introducir las seis sustituciones objetivo de aminoácido y generan pALT-HTX18, como sigue: adición de las mutaciones 135R y 144R a pALT-HTX13 utilizando las secuencias cebadoras:

Y135R: GGCACCGCCA CCTTTCGCCA GTACTGGTCC (SEQ ID NO: 7) y
 H144R: GTCCGCCGCA ACCGCGCTC GACCGGCTC (SEQ ID NO:8)

para hacer pALT-HTX13+135R/144R;

- 10 - la adición de las mutaciones 157D y 162H a pALT-HTX13+135R/144R utilizando las secuencias cebadoras:

Q162H: N157D: AACCACTTCG ACGCGTGG (SEQ ID NO: 9) y d GGCTCAGCAC GGCCTGACG (SEQ ID NO: 11).

para hacer pALT-HTX13+135R/144R/157D/162H;

- 15 - la adición de la mutación 161R a pALT-HTX13+135R/144R/157D/162H utilizando la secuencia cebadora Q161R: TTCGACGCGT GGGCTCGCCA CGGCCTGACG CTC (SEQ ID NO: 10), para hacer pALT-HTX13+135R/144R/157D/161R/162H;

- la adición de la mutación 165H a pALT-HTX13+135R/144R/157D/161R/162H utilizando la secuencia cebadora T165H: GCTCGCCACG GCCTGCACCT CGGGACGATG GAT (SEQ ID NO: 12), para hacer pALT-HTX18. El plásmido se muestra en su forma genérica, "pALT-H(I)TXn" en la FIGURA 3. La incorporación de todas las mutaciones se verifica mediante análisis de secuencia de ADN.

- 20 4.4 Reversión de la mutación Y1135R y la introducción de T131N en HTX18

Se realiza una ronda de mutagenia en el plásmido pALT-HTX18 utilizando el Sistema de Mutagenia in vitro Promega Altered Sites® II y la secuencia cebadora:

T131N, R135Y: GGCAACGCCA CCTTTTACCA GTACTGGCCCTTC (SEQ ID NO: 13)

- 25 para introducir la mutación T131N y R135Y y generar pALT-ITX1. El plásmido se muestra en su forma genérica, "pALTH(I)TXn" en la FIGURA 3. La incorporación de todas las mutaciones se verifica mediante el análisis de la secuencia de ADN

4.5 Reversión de la mutación Y135R en HTX18

Se realiza una ronda de mutagenia en el plásmido pALT-HTX18 utilizando el Sistema de Mutagenia in vitro Promega Altered Sites® II y la secuencia cebadora:

- 30 R135Y; GGCACCGCCA CCTTTTACCA GTACTGGTCC (SEQ ID NO14),

para introducir las mutaciones R135Y y generar pALT-HTX18R135Y. El plásmido se muestra en su forma genérica, "pALTH(I)TXn" en la FIGURA 3. La incorporación de todas las mutaciones se verifica mediante análisis de la secuencia de ADN.

4.6 Introducción de los sitios de glucosilación en las posiciones 34, 131. 180 y 182 dentro de HTX18:

- 35 Se realiza una ronda de mutagenia en el plásmido pALT-HTX18 utilizando el Sistema de Mutagenia in vitro Promega Altered Sites® II y las secuencias cebadoras:

T131N:	CCGTCCATCG AGGGCAACGC CACCTTTCGC (SEQ ID NO:21)
F180N:	GTGGAGGGTT ACAACAGCTC TGGCTCTGCT (SEQ ID NO: 22)
F180N, S182T:	GTGGAGGGTT ACAACAGCAC CGGCTCTCTGCT (SEQ ID NO: 23)
S182N:	GGTACTTTA GCAACGGGTC TGCTTCCATC (SEQ ID NO: 24)
	S182N, S184T: GGTACTTTA GCAACGGCAC CGCTTCCATC (SEQ ID NO: 25)
Q34N:	GGTCCCGGCG GGAAGTCTC CGTCAACTGG (SEQ ID NO: 26)
Q34N, S36T:	GGTCCCGGCG GGAAGTTCAC OGTCAGTGG (SEQ ID NO: 27)

para generar los plásmidos pALT-ITXn y pALT-ITXn' (en donde n es igual de 2 a 5). Se muestra un mapa genérico de estos plásmidos, "pALT-H(I)TXn", en la FIGURA 3. La incorporación de todas las mutaciones se verifica mediante análisis de la secuencia de ADN.

- 5 **Ejemplo 5;** Construcción de los vectores que dirigen la expresión de la xilanasa modificada y nativa de la Familia 11 en *Trichoderma reesei*.

5.1 Construcción de pC/ XHML-TV:

Un fragmento 2.4 kb que contiene el promotor y la señal de secreción del gen *xln2* (bp -2150 a +195 en donde +1 indica el codón de inicio ATG y +193-195 representa el codón 32) se amplifica con polimerasa Pwo del subclon genómico *xln2* pXYN2K-2 utilizando un cebador específico *xln2* que contiene un *PinAI* a bp 190-195 o codones 31 y 32 y el cebador inverso pUC (Cat. No. 18432-013, Gibco/BRL) que hibrida en la dirección 3' del sitio *KpnI* en el extremo 5' del gen *xln2*. Este producto PCR *xln2* se inserta como un fragmento de extremo romo en el sitio *SmaI* del poliligador pUC119 en tal orientación que el sitio *BamHI* del poliligador es 3' al sitio *PinAI*; esto genera el plásmido pUC/XynPSS (*Pin*). El mismo producto PCR *xln2* se reaisla de pUC/XynPSS (*Pin*) mediante digestión con *EcoRI* (que se amplifica como parte del poliligador pUC119 de pXYN2K-2) y *BamHI* y se inserta en el plásmido pBR322L (un derivado de pBR322 que contiene un adaptador *SphI*-*NotI*-*SalI* entre los sitios originales *SphI* y *SalI* a bp 565 y 650), también digerido con *EcoRI* y *BamHI*, para generar el plásmido pBR322LXP. Para facilitar el alto nivel de expresión de la xilanasa HTX4, un fragmento 1.3 kb *HindIII* que comprende bp -1400 a -121 del promotor *xln2* en pBR322LXP se reemplaza con un fragmento 1.2 kb *HindIII* que comprende bp -1399 a -204 del promotor *cbhI* que se aísla mediante digestión *HindIII* de pCOR132; esto genera el plásmido pBR322LXC. Finalmente, el sitio *EcoRI* de pBR322LXC luego se interrumpe con los ligadores *Klenow* y *SpeI* (Cat. No. 1086, New England Biolabs) se agregan para generar pBR322SpXC.

Un fragmento que contiene los codones 1-90 del gen xilanasa contiene las mutaciones N10H, Y27M, N29L se aísla del plásmido pUC/HTX4 (descrito en el ejemplo 4.1, anterior) mediante digestión con *NheI* y *BamHI* insertado en pCB219N-N digerido con *NheI* y *BamHI* para generar pHTX4/C2ter. Para hacer el pCB219N-N, se amplifica un fragmento terminador *cbh2* de la plantilla pZUK600 (descrito en el Ejemplo 2, anterior) utilizando un cebador homólogo a bp 2226-2242 de la región no traducida 3' publicada del gen *cbh2* (Chen et al., 1987) que contiene un poliligador corto que comprende los sitios *XbaI*-*NheI*-*BamHI*-*SmaI*-*KpnI* en el extremo 5' y el cebador delantero pUC (Cat. No. 1224, New England Biolabs) que hibrida en la dirección 5' del sitio *EcoRI* en el extremo 3' de *cbh2* en pZUK600. Este fragmento se digiere en los sitios *XbaI* y *EcoRI* construidos por ingeniería y se inserta en los sitios correspondientes de pUC119 para generar pCB219. Un adaptador *EcoRI*-*NotI* (cat. No. 35310-010, Gibco/BRL) se inserta en el sitio único *EcoRI* de pCB219 para generar pCB219N. Un fragmento 2.7 kb que comprende los codones 9-190 del gen HTX4 y el terminador *cbh2* se aísla de PHTX4/C2ter mediante digestión con *PinAI* y *NotI* y se inserta en pBR322SpXC digerido con *PinAI* y *NotI* para generar el casete de expresión pXHML-EC.

El gen de fosfotransferasa de higromicina *E. coli* (*hph*) utilizado como un marcador seleccionable para *T. reesei* se amplifica con la polimerasa Pwo del plásmido pVU1005 (Van den Elzen et al., 1989). Los cebadores se diseñan para introducir los sitios *SphI* y *KpnI* en los extremos 5' y 3' de la región codificante *hph* (bp 211-1236 de la secuencia publicada *hph*, Gritz y Davies, 1983), respectivamente. El producto PCR se digiere con *SphI* y *KpnI* y se inserta en los sitios correspondientes en la región de poliligador, de pUC119. El plásmido resultante, pHPT100, se utiliza como el plásmido de partida para la construcción del casete de selección.

Se introducen dos regiones ligadoras nuevas en el plásmido pHPT100 para facilitar la clonación del promotor y el fragmento terminador. Se inserta un ligador *HindIII*-*XbaI*-*XhoI*-*SphI* entre los sitios *HindIII* y *SphI* así como también un ligador *KpnI*-*NotI*-*SacI* que se inserta entre los sitios *KpnI* y *SacI* del poliligador pUC119 que permanece en pHPT100. Esta construcción se designa como pHPT102. Los cebadores utilizados para amplificar el promotor *pgk* (Vanhanen et al., 1991) se diseñan para introducir un sitio *XhoI* y un sitio *SphI* en las posiciones - 970 y +1 del promotor respectivamente. Estos sitios se utilizan posteriormente para insertar el promotor *pgk* en los sitios *XhoI* y *SphI* de pHPT102 para generar pHPT115. Se amplifica un fragmento terminador 1.3 kb *cbhI* con la polimerasa Pwo de pCB1Ta utilizando un cebador que hibrida a la región no traducida 3' de *cbhI* (bp 1864-1899 de la secuencia publicada *cbhI*) que contiene un sitio *KpnI* a bp 1877-1882 y el cebador inverso pUC (Cat. No., 18432-013, Gibco/BRL) que hibrida en la dirección 3' del sitio *EcoRI* en el extremo 3' del terminador *cbhI* en pCB1Ta. El producto

PCR terminador *cbh1* se digiere con *KpnI* y se inserta en el sitio único *KpnI* de pHPT115 para generar el plásmido del casete de selección, pHPT136. El terminador *cbh1* en el plásmido del casete de selección pHPT136 se reemplaza con el fragmento 2.6 kb *KpnI* que contiene el terminador transcripcional *xln2*. El terminador *xln2* se amplifica con la polimerasa Pwo del subclon genómico pXYN2K-2 utilizando un cebador para introducir un sitio *KpnI* directamente en la dirección 3' de bp 780 de la secuencia publicada *xln2* (Saarelainen et al. 1993) y el cebador delantero pUC (Cat. No. 18431-015, Gibco/BRL) que hibrida en la dirección 3' del extremo 3' del gen *xln2* en *pxyn2K-2*. El producto PCR de terminador *xln2* se digiere con *KpnI* y se liga a un fragmento 5.1 kb *KpnI* de pHPT136 que contiene el gen *hph* promotor *pgk* en pUC119 para generar el plásmido del casete de selección pHPT136X, manteniendo así el sitio único *NotI* en el extremo 3' del casete de selección.

Para elaborar el vector de transformación, el casete de expresión pC/XHML-EC se aísla mediante digestión *NotI*, interferencia del sitio *NotI* con la polimerasa de ADN Klenow, y la digestión *SpeI*. Al mismo tiempo, se prepara el plásmido del casete de selección para aceptar este fragmento mediante digestión con *XhoI*, interferencia del sitio *XhoI* con polimerasa de ADN Klenow y digestión posterior con *XbaI*. Se inserta el fragmento *NotI* de casete de expresión *SpeI* entre los sitios *XbaI* y *XhoI* en la dirección 5' del casete de selección de pHPT136X. El vector de transformación final, pC/XHML-TV (Figura 2), se lineariza mediante digestión con *NotI* antes de la introducción en *T. reesei* M2C38 por medio de bombardeo de microproyectil como se describe en el Ejemplo 7.

5.2 Construcción de pC/ XH(I)TXn-TV:

Cada fragmento de 3640 bp *SacI* que contiene las regiones de promotor, los genes modificados *xln2* y parte del terminador *cbh2* de pALT-H(I)TXn (descrito en el Ejemplo 4) se clona en el sitio *SacI* de un plásmido que contiene la secuencia terminadora restante *cbh2* en pSP72. Esto genera el casete de expresión que contiene los plásmidos, pC/xH(I) TXnPSP. El casete de selección que contiene el plásmido, pNCBglNSNB(r), se deriva de un plásmido que contiene el *N. crassa pyr4*, pFB6 (Radford et al, 1985). Un fragmento 3.2 kb *BglIII* de pFB6 que contiene el gen *N. crassa pyr4* (acceso GenBank M13448) así como también su promotor, terminador y algunas secuencias 5' UTR se clona en el sitio *BamHI* de puC119 modificado para contener los sitios *NotI*, *SmaI*, *NheI* y *BglIII* en el poliligador (entre *EcoRI* y *SacI*) para generar pNCBgl-NSNB(r). Un fragmento 2238 bp *KpnI* que contiene la región codificante completa *N. crassa pyr4*, el promotor y las secuencias terminadoras se aíslan de pNCBgl-NSNB(r) y se clona en el sitio único *KpnI* de pC/xHTX18PSP para generar pC/ xHTX18-TV (el plásmido se muestra en su forma genérica "pC/xH(I)TXn-TV", en la FIGURA 4),

5.3 Construcción de pC/ xHTX18(R135Y)-TV

El fragmento 3640 bp *SacI* que contiene las regiones promotoras, el gen modificado *xln2* y parte del terminador *cbh2* de pALT-HTX18(R135Y) se clona en el sitio *SacI* de un plásmido que contiene la secuencia terminadora restante *cbh2* en pSP72. Esta etapa genera el casete de expresión que contiene el plásmido pC/xHYX18(R135Y)PSP. El fragmento 2238bp *KpnI* que contiene la región codificante completa *N. crassa pyr4*, el promotor y las secuencias terminadoras se aíslan de pNCBgl-NSNB(r) (descrito en el Ejemplo 5.2, anterior) y se clona en el sitio único *KpnI* de los plásmidos que contienen el casete de expresión para generar pC/xHTX18(R135Y)-TV (el plásmido se muestra en su forma genérica "pC/xH(I)TXn-TV", en donde "n" es "18(R135Y)" en la FIGURA 4).

5.4 Construcción de pC/ xxynI-TV y pC/ xxynI-T118N-TV

Los productos PCR *xynI* modificados y tipo natural 675 bp (descritos en el ejemplo 3, anterior) se digieren con *NheI* y *BamHI* y se insertan en los sitios correspondiente en el plásmido pCB219N-N (descrito en el ejemplo 5.1, anterior) para generar los plásmidos pX1C2ter y pX1 (118N)C2ter. Un fragmento ~ 1,6 kb que comprende bp -1399 a -204 del promotor *cbh1*, bp -121 a -1 del promotor *xln2* y la secuencia que codifica la señal de secreción *xln2* se amplifica del plásmido pBR322LXC (descrito en el ejemplo 5.1) utilizando los cebadores para introducir un sitio *XbaI* a bp -1399 del promotor *cbh1* y un sitio *NheI* directamente en la dirección 3' del codón *Gln* que comprende el primer aminoácido de la proteína xilanasa II madura. Este producto PCR se digiere con *XbaI* y *NheI* y se inserta en la dirección 5' de las regiones codificantes de la xilanasa modificada y natural I en los sitios correspondientes de los plásmidos pX1C2ter y pX1(118N)C2ter para generar los plásmidos del casete de expresión pC/xxyn1 -EC y pC/xxyn1-T118N-EC. Los casetes de expresión se cortan mediante digestión con *XbaI*, interferencia del sitio *XbaI* con la polimerasa de ADN Klenow y digestión con *EcoRI*. El plásmido que contiene *N. crassa pyr4* pNCBglNSNB(r) (descrito en el Ejemplo 5.2, anterior) se prepara para aceptar este fragmento mediante digestión con *NotI*, interferencia del sitio *NotI* con polimerasa de ADN Klenow y digestión con *EcoRI*. El fragmento *XbaI* del casete de expresión *EcoRI*-*xynI* se inserta entre los sitios *EcoRI* y *NotI* en la dirección 3' del casete de selección para producir los vectores de transformación pC/xxynI-TV y pC/xxynI- T118N-TV (Figura 5). Los vectores de transformación finales se linearizan mediante digestión con *XbaI* antes de la introducción en protoplastos de *T. reesei* M2C38aux5 por medio de la transformación mediada por PEG de protoplastos como se describe en el Ejemplo 7.

5.5 Construcción de pc/ xxynC-T128N-TV

El plásmido del casete de expresión xilanasa I, pc/xxlnI-EC, se digiere con NheI y KpnI para abandonar la región codificante xilanasa I y el fragmento grande se liga con el producto PCR xynC modificado 700 bp (descrito en el ejemplo 3, anterior) digerido con NheI y KpnI para generar el plásmido del casete de expresión pc/xxynC-T128N-EC. El casete de expresión se corta mediante digestión con NotI, interferencia del sitio NotI con la polimerasa de ADN Klenow y digestión con XbaI. Al mismo tiempo, el plásmido del casete de selección que contiene hph pHPT136 (descrito en el ejemplo 5.1, anterior) se prepara para aceptar este fragmento mediante digestión con XhoI, interferencia del sitio XhoI con la polimerasa de ADN Klenow y digestión posterior con XbaI. El fragmento NotI del casete de expresión XbaI-xynC se inserta entre los sitios XbaI y XhoI en la dirección 5' del casete de selección de pHPT136. El vector de transformación final, pc/xxynC-T128N-TV (Figura 5), se lineariza mediante digestión con XbaI antes de la introducción en protoplasto *T. reesei* RutC30 por medio de la transformación mediada por PEG como se describe en el Ejemplo 7.

Ejemplo 6: Aislamiento de un auxotrofo pyr4 de la cepa *Trichoderma reesei* M2C38

Con el fin de utilizar el gen *N. crassa* pyr4 como un marcador seleccionable, un auxotrofo espontáneo pyr4 de M2C38 se aísla como sigue: 1×10^6 esporas de M2C38 se colocan en placas en medio mínimo que contiene 5 mM uridina y 0.15% (p/v) del ácido 5-fluoroorótico análogo de uridina (FOA) como se describió previamente para la sección de los auxotrofos pyr4 de *T. reesei* (Berges and Barreau, 1991). La capacidad de crecer en un medio que contiene FOA permitirá la selección de los mutantes interrumpido en la fosforibosil transferasa orotato que codifica el gen pyr2 o el 5'-fosfato descarboxilasa orotidina que codifica el gen pyr4. Las colonias resistentes a FOA espontáneas se someten a selección secundaria en medio mínimo con y sin uridina. Las esporas de colonias resistentes a FOA que no se harán crecer en medio mínimo luego se transforman con pNCBgINSNB(r) (descrito en el Ejemplo 5.2) mediante bombardeo de microproyectoril y se selecciona para crecimiento en medio mínimo. Solo aquellas cepas que se complementan mediante el gen *N. crassa* pyr4 en pNCBgINSNB(r) crecerán en medio mínimo y son auxotrofos verdaderos pyr4. Utilizando estos procedimientos, se selecciona el auxotrofo 5 (M2C38aux5) como un auxotrofo estable pyr4 de M2C38.

Ejemplo 7: Transformación del *Trichoderma reesei* M2C38.

7.1 Transformación por medio de bombardeo de microproyectoril

El sistema Biolístico PDS-1000/He (BioRad; E.I. DuPont de Nemours and Company) se utiliza para transformar esporas de la cepa *T. reesei* M2C38 y se realizan todos los procedimientos según se recomienda por el fabricante. Las partículas doradas (diámetro medio de 0.6 μ m, BioRad Cat. No. 1652262) se utilizan como microportadores. Se utilizan los siguientes parámetros en la optimización de la transformación: una presión de ruptura de 1100 psi, una presión de helio de 29 mm Hg, una distancia de espacio de 0.95 cm, una distancia de viaje microportador de 16 mm, y una distancia objetivo de 9 cm. Las placas se preparan con 1×10^6 esporas en medio mínimo agar (ver ejemplo 7.2. adelante). Se incuban placas de bombardeo a 28° C. Los transformantes se pueden observar después de 3-6 días de crecimiento tiempo en el cual las colonias se transfieren a agar MM agar en platos petri individuales y se dejan crecer y se esporulan.

7.2 Transformaciones de protoplasto utilizando polietilenglicol (PEG) y CaCl₂.

Se colocan en placas 5×10^6 esporas de M2C38aux5 en celofano estéril en agar de Dextrosa de Papa complementado con 5 mM uridina y se incuban durante 20 horas a 30° C para facilitar la germinación de espóra y el crecimiento micelial. Los discos de celofano con micelas se transfieren a 10 mL de una solución de protoplasto que contiene 7.5 g/L de Driselasa y 4 g/L de betaglucanasa (InterSpex Products Inc., Cat. Nos. 0465.1 y 0439-2, respectivamente) en regulador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.5 que contiene sulfato de amonio 0.6 M (Regulador P). La capa micelial se digiere durante 5 horas a 28° C con agitación a 60 rpm. Se recuperan los protoplastos mediante centrifugación a 1000-1500 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavan los protoplastos con 5 mL de Regulador P y se centrifuga de nuevo a 1000-1500 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se resuspenden protoplastos en 1 ml de regulador STC (1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCL, pH 7.5) y se separan de micelas no digeridas mediante filtración a través de No. 60 MIRACLOTH™ estéril y se recolectan en un tubo de microcentrífuga estéril.

Para transformación, se combinan 0.1 mL de protoplastos resuspendidos (aproximadamente 5×10^6 protoplastos) con 2 μ g de ADN de vector y 25 μ L de solución PEG (25% de PEG 4000, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5). Después de incubación en hielo durante 30 min, se agrega 1 mL de solución PEG y la mezcla se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. La mezcla de transformación se diluye con 2 mL de 1.2 M sorbitol en solución PEG y 0.75 mL de la mezcla se agrega 25 mL de medio agar fundido MMSS (ver adelante) enfriado a aproximadamente 47° C y la suspensión de protoplasto sobre agar MM (ver adelante). Las placas se incuban a 30° C hasta que es visible el crecimiento de colonia. Los transformantes se transfieren a placas individuales que contienen agar MM y se

les permiten esporular. Se recolectan esporas y se colocan en placas en dilución alta sobre agar MM para aislar los transformantes homocarión, que luego se colocan en placas en PDA para permitir el crecimiento y suficiente esporulación para inocular los cultivos detectados descritos en el Ejemplo 9, adelante

Medio mínimo agar (MM) que contiene:

Reactivo	Por L
KH_2PO_4	10 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	6 g
Na_3 Citrato- $2\text{H}_3\text{O}$	3 g
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	1.6 mg
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.4mg
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 mg
Agar	20 g
20% Glucosa f.s.	50 mL
1 M $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_3\text{O}$ f.s.	4 mL

pH a 5.5

- 5 El agar MMSS contiene los mismos componentes como agar MM más 1.2 M sorbitol, 4 mM MgSO_4 , 1 g/L YNB (Base de Nitrógeno de Levadura w/o Aminoácidos de DIFCO Cat. No.291940) y 0.12 g/L de aminoácidos (-Ura DO Complementado de CLONTECH Cat. No.8601-1).

Ejemplo 8: Detección de actividad xilanasa en filtrados de cultivo *T. reesei*

Detección de actividad de xilanasa termófila para la expresión de HTX18, HTX18 (R135Y), ITX1-5, y ITX3'-5

- 10 La presencia de la actividad de xilanasa termófila en los filtrados de cultivo de los transformantes *T. reesei* se determina al medir la liberación de los azúcares de reducción de un sustrato arabinoxilano soluble a 65° C. Específicamente, 30 μL de una dilución apropiada del filtrado de cultivo se preincuba a 65° C durante 5 min. Posteriormente, 300 μL de una solución 1.5% de arabinoxilano de trigo (Megazyme International) rediseuelto en regulador de fosfato de pH 7.0 que contiene 0.04% de Tween, también se pre-incuba a 65° C durante 5 min, se
- 15 agrega a la muestra de enzima en un tubo microcentrífuga. Los tubos se centrifugan brevemente para facilitar la mezcla y luego la reacción se incuba a 65° C durante 20 min. Se detiene la reacción de hidrólisis enzimática mediante la adición de 150 μl de la solución de detección que contiene 43.64 mM ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico, 0.93M tartrato de potasio y sodio, 0.4M hidróxido de sodio y 0.4 M hidróxido de potasio. La solución resultante luego se hierve durante 10 minutos para facilitar la reacción del ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzoico con
- 20 los azúcares de reducción liberados del sustrato arabinoxilano mediante la enzima. Los tubos se enfrían en baño de agua frío durante 5 minutos y luego se agrega 1.5 mL de agua desionizada. Se mide la absorbancia de la solución a 530 nm. La cantidad de azúcar de reducción liberado mediante las xilanasas termófilas durante la incubación se calcula de una curva estándar de mediciones A530 de diversas diluciones de una solución de xilosa pura con la misma solución de parada.

- 25 Detección de la actividad xilanasa I debido a la sobreexpresión de *T. reesei* xilanasa I y *S. lividans* xilanasa C-131N natural o modificada

La detección de la actividad xilanasa I en los filtrados de cultivo de las cepas *T. reesei* que sobreexpresan la xilanasa modificada o natural I se lleva a cabo como se describe en la Sección 8.1, anterior, excepto que las incubaciones se llevan a cabo a 40 °C y se prepara el sustrato de 1.5% de arabinoxilano de trigo en acetato den regulador a pH 4.0 que contiene 0.04% de Tween.

30

La detección de la actividad xylC-131N en filtrados de cultivo de las cepas *T. reesei* que sobreexpresan la xilanasa C *S. lividans* modificada se lleva a cabo como se describe en la Sección 8.1, anterior, excepto que las incubaciones se llevan a cabo a 40° C y se prepara el sustrato de 1.5% de arabinoxilano de trigo en regulador de acetato a pH 6.0.

Ejemplo 9: Producción de xilanasas modificadas en cultivos líquidos

Las colonias individuales de Trichoderma se transfieren a placas PDA para la propagación de cada cultivo. La esporulación es necesaria para la inoculación uniforme de matraces de agitación que se utilizan en la prueba de la capacidad del cultivo para producir las xilanasas y celulasa termófila. El medio de cultivo se compone de los siguientes:

Componente	g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.35
KH ₂ PO ₄	4.00
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.02
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.53
CSL	6.25
C _a CO ₃	10.00
Fuente de carbono**	5-200

Componente	g/L
Elementos de traza*	1 mL/L

*La solución de elementos de traza contiene 5 g/L FeSO₄·7H₂O; 1.6g/L MnSO₄·H₂O; 1.4 g/L ZnSO₄·7H₂O.

** glucosa, floc Solka, lactosa, celobiosa, soforosa, jarabe de maíz, o Avicel. La fuente de carbono se puede esterilizar separadamente como una solución acuosa a pH 2 a 7 y se agrega al medio restante o a través del curso de la fermentación.

5

Los transformantes individuales se hacen crecer en el medio anterior en cultivos de 150 mL en matraces de 1 litro o en cultivos 1 mL en microplacas de 24 pozos. El pH inicial es 5.5 y el medio se esteriliza mediante autoclave de vapor durante 30 minutos a 121° C antes de inoculación. Para las células transformadas y naturales, se aíslan esporas de las placas PDA como se describe en el Ejemplo 8 y 104-106 esporas por mL se utilizan para inocular cada cultivo. Los cultivos se agitan a 200-300 rpm en una temperatura de 28° C durante un periodo de 6 días. La biomasa se separa del filtrado que contiene la proteína secretada mediante filtración a través de filtros de microfibras de vidrio GF/A (Whatman) o mediante centrifugación a 12000 rpm. La concentración de la proteína se determina utilizando el Ensayo de Proteína Bio-Rad (Cat. No. 500-0001). La actividad de la xilanasas se determina como se describe en el Ejemplo 8. Las cepas que expresan la actividad de xilanasas mayor con cada construcción y exhiben producción de proteína general mayor se seleccionan para crecimiento en fermentaciones piloto de 14 litros.

10

15

Ejemplo 10: Producción de xilanasas en fermentaciones de tanda de carga de 14L.

Se hacen crecer cepas T. reerei en Agar de Dextrosa de Papa a 28-30° C hasta que se obtiene a lawn confluyente de esporas. Se recolectan esporas y se utilizan para inocular 750 ml de medio Berkeley (10 g/L de glucosa, 1,4 g/L de (NH₄)₂SO₄, 2.0 g/L de KH₂PO₄, 0.31 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0.53 g/L de CaCl₂; 5.1 g/L corn steep seco, 5 mg/L de FeSO₄·7H₂O; 0.8 mg/L de MnSO₄·H₂O, 0.7 mg/L de ZnSO₄·7H₂O) en un matraz baffled de 2 L. Después de 3 días de crecimiento a 28° C y 150 rpm, este cultivo se utiliza para inocular 10 L del medio de fermentación con la siguiente composición inicial: 13 g/L de glucosa, 2.2 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1.39 g/L de KH₂PO₄, 0.7 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0.195 g/L de CaCl₂, 6 g/L de corn steep seco, 3.75 mg/L de FeSO₄·7H₂O; 1.2 g/L de MnSO₄·H₂O, 1.05 g/L de ZnSO₄·7H₂O. Una fermentación aeróbica de tanda de carga utilizando una o más para inducir las fuentes de carbohidrato que se mencionan en el Ejemplo 9 se corre durante 6 días a pH 4.5 y 28-30° C en un fermentador de 14L New Brunswick Microferm. Después de 6 días, el cultivo se filtra sobre Harbolito y el filtrado cultivado se ajusta a pH 4.5 y se preserva con 0.5 % de benzoato para evitar el crecimiento microbiano.

20

25

La expresión de las xilanasas modificadas no alteran significativamente el crecimiento de las cepas anfitrionas Trichoderma, cuando todas las fermentaciones se acumulan en biomasa de cantidades similares mediante el final de 6 días de crecimiento (Tabla 3). La concentración de biomasa en las muestras de fermentador se determina como sigue: 5-10 g de caldo de cultivo de fermentación se pesa y se registra. El caldo de cultivo de fermentación luego se filtra sobre un papel de filtro de microfibras de vidrio prepesado (Whatman) y se lava con agua. La biomasa filtrada se seca durante la noche en un horno de 100° C. El peso de la biomasa seca se determina al sustraer la masa de papel de filtro de la masa de biomasa seca más papel de filtro. La biomasa se calcula como sigue:

30

35 Biomasa (g/L) = Masa de biomasa seca (g) X Densidad de la muestra (g/mL) x 1000 mL

Masa de biomasa húmeda (g) L

Las cepas que producen las xilanasas modificadas comprenden cualquiera de las mutaciones X34N, X131N, X180N o X182N (ver Tabla 2 para la descripción de las mutaciones) que producen niveles mayores de la proteína total que las cepas producen las xilanasas no modificadas correspondientes (Tabla 3). La concentración de proteína en las muestras de fermentador diario se determina utilizando el Ensayo de Proteína Bio- Rad (Cat. No. 500-0001).

Tabla 3. Expresión de xilanasas modificadas de las cepas *T. reesei* transformadas (actividad de biomasa y xilanasas)

Cepa	Enzima	Nuevo sitio N-X-S/T	Proteína (mg/mL)	Biomasa (g/L)	Actividad de xilanasas (XU/mL)	Aumento en la expresión veces x (% de aumento) ^b
RutC30	Xilanasas natural	-	40.89	30.35	812.5 ^c	-
M2C38	Xilanasas natural	-	23.93	18.11	141 ^a	-
P67AB	HTX18	None	18.9	20.1	3302	-
2013B	HTX18-R135Y	None	34.9	24.0	6166	1.8x(86%)
P210A	ITX1 (T131N, R135Y)	131N	44.7	26.5	15288	4.6 x (36%) ^c 2.5 x (150%) ^d
P284A	ITX2	131N	42.9	21.3	9691	2.9 x (190%)
F304B	ITX3	180N	43.2	20.5	6546	2.0 (100%) ^x
P321H	ITX3'	180N/182T	40.5		7192	2.2 x (120%)
P322B	JT4	182N	39.0	20.2	11083	3.4 x (240%)
P323B	JTX4'	182N/184T	33.0	19.2	12061	3.6 x (260%)
P331B	TTX5	34N	34.5	22.5	5275	1.6 x (60%)
P336B	ITX5'	34N/36T	38.0	22.6	6933	2.1 x (110%)
P300A	Xyn 1	No	31.0	23.2	136 ^b	-
P279A	Xyn 1.131N	118N	31.75	25.5	2042 ^a	15.0 x (1400%)
P348C	xlnC-131N	128M	35.2	23.8	2365 ^a	ND

^a medido a 40° C, Ph 4.0.

^b relativo a la expresión de la xilanasas no modificada correspondiente que comprende la misma secuencia de aminoácido principal excepto para el nuevo motivo de glucosilación introducido.

^c eficiencia de expresión de xilanasas con relación a P67AB que expresa una xilanasas modificada que comprende la mutación Y135R pero son 131N.

^d eficiencia de expresión de xilanasas con relación a la cepa 2013B que expresa una xilanasas modificada que no comprende el T131N o la mutación Y135R.

^e medido a 40° C, pH 6.0.

Se determina la actividad de xilanasas como se describe en el Ejemplo 8.

Las cepas P210A y P284A, que comprenden las construcciones genéticas de xilanasas modificadas contienen el motivo de N-glucosilación N-X-T en las posiciones 131-133 de la secuencia xilanasas II *T. reesei* además de las mutaciones presentes en HTX18, producen actividad xilanasas mayor de 4.6- y 2.9 veces que la cepa de producción HTX18, P67AB, respectivamente.

Las cepas P304B y P321H, que comprenden las construcciones genéticas de la xilanasas modificadas contienen el motivo de N-glucosilación N-X-S/T en las posiciones 180-182 de la secuencia xilanasas II *T. reesei* además de las mutaciones presentes en HTX18, que produce hasta la actividad de xilanasas dos veces mayor que la cepa P67AB que expresa el HTX18 no modificado.

Las cepas P322B y P323B, que comprenden las construcciones genéticas de xilanasas modificadas contienen el motivo de N-glucosilación N-X-S/T en las posiciones 182-184 de la secuencia de xilanasas II *T. reesei* además de las mutaciones presentes en HTX18, producen hasta la actividad mayor de 3.5 veces que la cepa P67AB que expresa el HTX18 no modificado.

Las cepas P331B y P336B, que comprenden las construcciones genéticas de xilanasa modificada contienen el motivo de N-glucosilación N-X-S/T en las posiciones 34-36 de la secuencia de xilanasa II T. reesei además de las mutaciones presentes en HTX18, produce la actividad de xilanasa 1.6- y 2.1 veces mayor que la cepa P61AB que expresa el HTX18 no modificado, respectivamente.

5 La cepa P279A, que comprende una construcción génica de xilanasa modificada que contiene el motivo de N-glucosilación N-X-T en las posiciones 118-120 de la secuencia xilanasa I T. reesei natural, produce actividad de xilanasa 15.0 veces mayor que la cepa P300A que expresa la xilanasa no modificada I. Esta mutación es equivalente a X131N de la xilanasa II T. reesei (ver FIGURA 1).

10 La cepa P348C, que comprende una construcción génica de la xilanasa modificada que contiene el motivo de N-glucosilación N-X-T en las posiciones 128-130 de la secuencia xilanasa C S. lividans natural produce de forma similar altos niveles de actividad xilanasa como la cepa P279A, que comprende una construcción génica de xilanasa modificada que contiene el motivo de N-glucosilación N-X-T en las posiciones 118-120 de la secuencia de xilanasa I natural, que es comercialmente significativa para la fabricación de la xilanasa para aplicaciones industriales. Esta mutación es equivalente a X131N de xilanasa II T. reesei (ver FIGURA 1).

15 Las cepas P321H, P323B y P336B, que comprenden las construcciones genéticas de xilanasa modificada contienen los motivos N-X-T de glucosilación producen cantidades mayores de la actividad de xilanasa ya que la cepa P304B, P322B y P331B, que comprende las construcciones genéticas de xilanasa modificada contienen los motivos N-X-S de glucosilación en las mismas posiciones respectivas dentro de la secuencia de xilanasa II.

20 **Ejemplo 11:** Comparación de la alcalofiliidad y termofiliidad de la xilanasa modificada ITX1 con su contraparte natural HTX18

25 Se determinan las mediciones de actividad como se describe en el Ejemplo 8. Para determinar la alcalofiliidad (Figura 6), la temperatura de incubación del ensayo se reduce a 55° C y el regulador de fosfato que contiene Tween-20 y las soluciones de sustrato NSP se ajusta al pH deseado para mediciones de actividad. Para determinar la termofiliidad (Figura 7), la temperatura de incubación se ajusta a la temperatura deseada para mediciones de actividad.

30 La xilanasa ITX1 modificada producida por la cepa P210A, que comprende las mismas mutaciones como HTX18 pero sin la mutación Y13SR y la mutación T131N (ver Tabla 2), tiene un pH similar y perfil de actividad de temperatura como la xilanasa HTX18 (Figuras 6 y 7). Así la adición de la mutación T131N no altera las propiedades bioquímicas y biofísicas de la xilanasa debido a otras mutaciones. Esto es significativo para la utilidad de aumentar la expresión de cualquier Familia 11 objetivo de Trichoderma por medio de la introducción de la mutación X131N (numeración TrX).

Ejemplo 12: Análisis espectral de masa de la enzima ITX1 que comprende la mutación T131N

35 El filtrado de fermentación producido por la cepa n P210A y que contiene la xilanasa modificada ITX1 se diluyen en regulador 2X Laemmli (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 5% de B-mercaptoetanol), se hierven durante 5 min y se enfrían. Las proteínas se separan mediante SDS-PAGE utilizando un gel de resolución que contiene 12 % de acrilamida (37.5:1 acrilamida: bisacrilamida, BioRad Cat. No. 161-0122) utilizando Electroforesis Celular Mini-PROTEAN® 3 (BioRad Cat. No. 165-3301) que corre a 200V (constante) durante 40 min. Las proteínas en el gel se visualizan con tinte utilizando Tinte Coomassie Bio-Safe™ n (BioRad Cat. No.161-0786). La banda de proteína a 20 kDa se separa del gel, se destiñe y se digiere en gel con tripsina como por protocolos estándar. En resumen, las bandas de gel se enjuagan con 30% de acetonitrilo en bicarbonato de amonio 100 mM durante aproximadamente 10 minutos y se descarga el sobrenadante. Este procedimiento se repite hasta que se ha removido completamente el tinte. Las bandas de gel luego se lavan con agua desionizada y luego mediante acetonitrilo. Aproximadamente, 20 mL de bicarbonato de amonio 50 mM que contiene 200 ng de tripsina se agrega a cada banda de gel. Las bandas de gel dejan volver a hinchar durante 10 minutos y se cubren con aproximadamente 45 30 mL de bicarbonato de amonio 50 mM (suficiente para asegurar que las piezas de gel se sumerjan completamente durante la digestión). La digestión se le permite continuar durante 4 horas después de lo cual el líquido de cada muestra se transfiere a un frasco fresco. Las soluciones se evaporan en un Savant en un volumen final de aproximadamente 10 mL.

50 Las soluciones de digestión, se analizan mediante espectrometría de masa nanoHPLC-tandem (nanoLC-MS/MS) utilizando acoples del sistema GapLC (Waters) con un espectrómetro de masa de vuelo de cuadrupolo de híbrido Q-TOF2 (Waters), 3 mL de las digestiones 10 mL se inyectan en un cartucho de precolumna macro C18 0.3 x 5 mm (Dionex/LC Packings). Los péptidos se retienen mientras que las sales y otros componentes de solución se lavaron. La trampa luego se pone en línea con una columna nano-Serices 75 mm x 150 mm C18 (Dionex/LC-Packings) y los péptidos se separan mediante elución de gradiente (3-45% de acetonitrilo, 0.2% de ácido fórmico en 55 35 minutos seguido por un aumento rápido a 85 % a 38.5 minutos). El espectrómetro de masa se fija para adquirir el

espectro MS/MS en modo automático para iones cargados doblemente y triplemente. La prioridad se da para iones cargados multiplicados del péptido trípico 123-141 con y sin un residuo adherido HexNAc. El espectro MS/MS se analiza manualmente.

Tabla 4. Detección de glucosilación a 131 N mediante LC-MS/MS

Péptido	Tiempo retención LC	M/z ión doblemente cargado	Secuencia de aminoácido	Distribución
as 123-141	25.4 min	1203.5367	VNAPSIEGN*ATFYQYWSVR+ N-acetil hexosamina	~80%
aa 123-141	26.7 min	1102.009	VNAPSIEGNATFYQYWSVR	~20%

5 Estos resultados confirman que la cepa anfitriona *Trichoderma* reconoce el motivo de N-glucosilación consensus NAT introducido por medio de la mutación de T131N y la introducción de este motivo de glucosilación funcional facilita el nivel de expresión alto de la xilanasas modificadas de *Trichoderma*.

10 En resumen, la xilanasas modificadas que demuestra la eficiencia aumentada de la expresión de *Trichoderma* se puede construir a través de la mutación de X131N (numeración TrX). Un aumento similar en la eficiencia de la expresión también se puede obtener al introducir otros motivos N-X-S/T de N-glucosilación en una xilanasas de la Familia 11 en las posiciones X34N, X180N, X182N, X34NS36T, X180N-S182T, X182N-S184T, o una combinación de los mismos, en posiciones equivalentes cuando la xilanasas de la Familia 11 se alinea con TrxII, como se describe aquí.

15 La presente descripción ha descrito xilanasas mutantes que exhiben la expresión aumentada y secreción de una *Trichoderma* mejor. Estas xilanasas mutantes se pueden utilizar en procesos industriales tales como procesamiento de pulpa y papel, como aditivos de alimento para animal, o en aplicaciones de panadería y bebidas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> logen Bio-Products Corporation

20 White, Theresa C

Giroux, Genevieve R

Wallace, Katie E.A.

<120> Xilanasas Modificadas que Exhiben Expresión Mejorada

<130> 08899867WO

25 <140> aún no mostrado

<141> 2005-03-24

<150> US 60/556,061 <151> 2004-03-25

<160> 44

<170> PatentIn version 3.2

30 <210> 1

<211> 190

<212> PRT

<213> *Trichoderma reesei* (Tr2)

<400> 1

ES 2 377 408 T3

Gln Thr Ile Gln Pro Gly Thr Gly Tyr Ala 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

Ser 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

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160

Gln Gln Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Glu Ile Val Ala Val
 165 170 175

Arg Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 2

<211> 178

5 <212> PRT

<213> Trichoderma reesei (Tr1)

<400> 2

ES 2 377 408 T3

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

72

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

5 <213> cebador mutagénico S75A

<400> 3

agctacctcg ccgtgtacgg 20

<210> 4

<211> 19

10 <212> ADN

<213> cebador mutagénico L105H

<400> 4

ccaccaagca cggcgaggt 19

<210> 5

15 <211> 33

<212> ADN

<213> cebador mutagénico S125A

<400> 5
acgcagcgcg tcaacgcccc gtccatcatc ggc 33
<210> 6
<211> 33
5 <212> ADN
<213> cebador mutagénico I129E
<400> 6
aacgccccgt ccatcgaggg caccgccacc ttt 33
<210> 7
10 <211> 30
<212> ADN
<213> cebador mutagénico Y135R
<400> 7
ggcaccgccca ccttgcgcca gtactgggcc 30
15 <210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> cebador mutagénico H144R
<400> 8
20 gtccgccgca accgccgctc gagcggctc 29
<210> 9
<211> 18
<212> ADN
<213> cebador mutagénico N157D
25 <400> 9
aaccacttcg acgcgtgg 18
<210> 10
<211> 33
<212> ADN
30 <213> cebador mutagénico Q161R
<400> 10

ttcgacgcgt gggctcgcca cggcctgacg ctc 33
<210> 11
<211> 19
<212> ADN
5 <213> cebador mutagénico Q162H
<400> 11
ggctcagcac ggctgacg 19
<210> 12
<211> 33
10 <212> ADN
<213> cebador mutagénico T165H
<400> 12
gctcgccacg gcctgcacct cgggacgatg gat 33
<210> 13
15 <211> 30
<212> ADN
<213> cebador mutagénico T131N, R135Y
<400> 13
ggcaacgcca cctttacca gtactggtcc 30
20 <210> 14
<211> 30
<212> ADN
<213> cebador de reversión R135Y
<400> 14
25 ggcaccgcca cctttacca gtactggtcc 30
<210> 15
<211> 30
<212> ADN
<213> T128N
30 <400> 15
ccctcgtgg aaggcaaca gacctccag 30

<210> 16

<211> 24

<212> ADN

<213> XynC-5F (Nhe)

5 <400> 16

gcccacgccg ctagcacat cacc 24

<210> 17

<211> 23

<212> ADN

10 <213> XynC-3R (Kpn)

<400> 17

cgtccaccgg taccaggtca acc 23

<210> 18

<211> 23

15 <212> ADN

<213> T118N

<400> 18

ccatccaggg caacgcgacc ttc 23

<210> 19

20 <211> 24

<212> ADN

<213> Xyn1-F

<400> 19

cgtcgtgcta gcatcaacta cgac 24

25 <210> 20

<211> 19

<212> ADN

<213> Xyn1-R (BamHI)

<400> 20

30 ggatcctagt tgctgacac 19

<210> 21

<211> 30

<212> ADN

<213> T131N

<400> 21

5 cgtccatcg agggcaacgc caccttcgc 30

<210> 22

<211> 30

<212> ADN

<213> F180N

10 <400> 22

gtggagggtt acaacagctc tggctctgct 30

<210> 23

<211> 30

<212> ADN

15 <213> sintético

<400> 23

gtggagggtt acaacagcac cggctctgct 30

<210> 24

<211> 30

20 <212> ADN

<213> F180N, S182T

<400> 24

ggttacttta gcaacggctc tgctccatc 30

<210> 25

25 <211> 30

<212> ADN

<213> S182N, S184T

<400> 25

ggttacttta gcaacggcac cgctccatc 30

30 <210> 26

<211> 30

<212> ADN

<213> IS4N

<400> 26

ggtcccggcg ggaactctc cgtaactgg 30

5 <210> 27

<211> 30

<212> ADN

<213> 134N, S36T

<400> 27

10 ggtcccggcg ggaactcac cgtaactgg 30

<210> 28

<211> 189

<212> PRT

<213> Asparigillus awamori var. kawachi

15 <400> 28

Arg Ser Thr Pro Ser Ser Thr Gly Glu Asn Asn Gly Tyr Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Asp Val Thr Tyr Thr Asn Gly Asn Ala
20 25 30

Gly Ser Tyr Ser Val Glu Trp Ser Asn Val Gly Asn Phe Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Asn Pro Gly Ser Ala Lys Asp Ile Thr Tyr Ser Gly Asn

ES 2 377 408 T3

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

Phe Thr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Thr Phe Ser Met Tyr Trp Glu Asp
 20 25 30

Gly Val Ser Ser Asp Phe Val Val Gly Leu Gly Gly Trp Thr Thr Gly
 35 40 45

Ser Ser Asn Ala Ile Thr Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser
 50 55 60

Ala Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Tyr Tyr Ile Val Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala
 85 90 95

Thr Ser Leu Gly Thr Val Tyr Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Gln Val Cys
 100 105 110

Thr Asp Thr Arg Ile Asn Glu Pro Ser Ile Thr Gly Thr Ser Thr Phe
 115 120 125

Thr Gln Tyr Phe Ser Val Arg Glu Ser Thr Arg Thr Ser Gly Thr Val
 130 135 140

Thr Val Ala Asn His Phe Asn Phe Trp Ala His His Gly Phe His Asn
 145 150 155 160

Ser Asp Phe Asn Tyr Gln Val Val Ala Val Glu Ala Trp Ser Gly Ala
 165 170 175

Gly Ser Ala Ala Val Thr Ile Ser Ser
 180 185

<210> 30

<211> 185

<212> PRT

5 <213> Bacillus circulans

<400> 30

ES 2 377 408 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Val Lys Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg

100 105 110

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

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

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

Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
 180 185

<210> 31

<211> 201

<212> PRT

5 <213> Bacillus pumilus

<400> 31

ES 2 377 408 T3

Arg Thr Ile Thr Asn Asn Glu Met Gly Asn His Ser Gly Tyr Asp Tyr
1 5 10 15

Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly Asn Thr Ser Met Thr Leu Asn Asn Gly
20 25 30

Gly Ala Phe Ser Ala Gly Trp Asn Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg
35 40 45

Lys Gly Lys Lys Phe Asp Ser Thr Arg Thr His His Gln Leu Gly Asn
50 55 60

Ile Ser Ile Asn Tyr Asn Ala Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ser Tyr
65 70 75 80

Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Gln Ser Pro Leu Ala Glu Tyr Tyr Ile
85 90 95

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

Phe Tyr Ala Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Val
115 120 125

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

Val Arg Gln Thr Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Ser Val Ser Ala His
145 150 155 160

Phe Arg Lys Trp Glu Ser Leu Gly Met Pro Met Gly Lys Met Tyr Glu
165 170 175

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

Met Thr Asn Gln Leu Phe Ile Gly Asn
195 200

<210> 32

<211> 185

<212> PRT

5 <213> Bacillus subtilus

<400> 32

ES 2 377 408 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Asn Trp Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser
 165 170 175

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
 180 185

<210> 33

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Clostridium acetobutylicum

<400> 33

ES 2 377 408 T3

Ser Ala Phe Asn Thr Gln Ala Ala Pro Lys Thr Ile Thr Ser Asn Glu
1 5 10 15

Ile Gly Val Asn Gly Gly Tyr Asp Tyr Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly
20 25 30

Asn Thr Ser Met Thr Leu Lys Asn Gly Gly Ala Phe Ser Cys Gln Trp
35 40 45

Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Asp
50 55 60

Thr Gln Thr Tyr Lys Gln Leu Gly Asn Ile Ser Val Asn Tyr Asn Cys
65 70 75 80

Asn Tyr Gln Pro Tyr Gly Asn Ser Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr
85 90 95

Ser Ser Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly Ser Trp
100 105 110

Arg Pro Pro Gly Gly Thr Ser Lys Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly
115 120 125

Ile Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Ile Asn Gln Pro Ser Ile Gln
130 135 140

Gly Asn Thr Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr Lys Arg
145 150 155 160

Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Lys His Phe Ala Ala Trp Glu Ser
165 170 175

Lys Gly Met Pro Leu Gly Lys Met His Glu Thr Ala Phe Asn Ile Glu
180 185 190

Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Lys Ala Asp Val Asn Ser Met Ser Ile Asn
195 200 205

Ile Gly Lys
210

<210> 34

<211> 206

<212> PRT

5 <213> Clostridium stercorarium

<400> 34

ES 2 377 408 T3

Gly Arg Ile Ile Tyr Asp Asn Glu Thr Gly Thr His Gly Gly Tyr Asp
 1 5 10 15

Tyr Glu Leu Trp Lys Asp Tyr Gly Asn Thr Ile Met Glu Leu Asn Asp
 20 25 30

Gly Gly Thr Phe Ser Cys Gln Trp Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe
 35 40 45

Arg Lys Gly Arg Lys Phe Asn Ser Asp Lys Thr Tyr Gln Glu Leu Gly
 50 55 60

Asp Ile Val Val Glu Tyr Gly Cys Asp Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser
 65 70 75 80

Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Phe Leu Val Glu Tyr Tyr
 85 90 95

Ile Val Glu Ser Trp Gly Ser Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys
 100 105 110

Gly Thr Ile Thr Gln Trp Met Ala Gly Thr Tyr Glu Ile Tyr Glu Thr
 115 120 125

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

Tyr Trp Ser Val Arg Thr Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val
 145 150 155 160

Thr Glu His Phe Lys Gln Trp Glu Arg Met Gly Met Arg Met Gly Lys
 165 170 175

Met Tyr Glu Val Ala Leu Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Tyr
 180 185 190

Ala Asn Val Tyr Lys Asn Glu Ile Arg Ile Gly Ala Asn Pro
 195 200 205

<210> 35

<211> 211

<212> PRT

5 <213> Ruminococcus flavefaciens

<400> 35

ES 2 377 408 T3

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

Glu Met Trp Asn Gln Asn Gly Gln Gly Gln Ala Ser Met Asn Pro Gly
 20 25 30

Ala Gly Ser Phe Thr Cys Ser Trp Ser Asn Ile Glu Asn Phe Leu Ala
 35 40 45

Arg Met Gly Lys Asn Tyr Asp Ser Gln Lys Lys Asn Tyr Lys Ala Phe
 50 55 60

Gly Asn Ile Val Leu Thr Tyr Asp Val Glu Tyr Thr Pro Arg Gly Asn
 65 70 75 80

Ser Tyr Met Cys Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Met Glu Tyr
 85 90 95

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

Glu Val Lys Gly Thr Val Ser Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Asp Ile Arg
 115 120 125

Lys Thr Met Arg Tyr Asn Gln Pro Ser Leu Asp Gly Thr Ala Thr Phe
 130 135 140

Pro Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Thr Ser Gly Ser Ala Asn Asn Gln
 145 150 155 160

Thr Asn Tyr Met Lys Gly Thr Ile Asp Val Ser Lys His Phe Asp Ala
 165 170 175

Trp Ser Ala Ala Gly Leu Asp Met Ser Gly Thr Leu Tyr Glu Val Ser
 180 185 190

Leu Asn Ile Glu Gly Tyr Arg Ser Asn Gly Ser Ala Asn Val Lys Ser
 195 200 205

Val Ser Val
 210

<210> 36

<211> 197

<212> PRT

5 <213> Schizophyllum cimmune

<400> 36

ES 2 377 408 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Lys Ala Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Thr Val Asp Val Gln Cys

145 150 155 160

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

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

Thr Ile Thr Val Thr
195

<210> 37

<211> 189

<212> PRT

5 <213> Streptomyces sp. No. 36a

<400> 37

ES 2 377 408 T3

Ala Thr Thr Ile Thr Asn Glu Thr Gly Tyr Asp Gly Met Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Gly Gly
20 25 30

Gly Ser Tyr Ser Thr Arg Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Ala Asn Gly Gly Arg Arg Thr Val Arg Tyr Thr Gly Trp
50 55 60

Phe Asn Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Gly Cys Leu Tyr Gly Trp Thr Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Ser Tyr Arg
85 90 95

Pro Thr Gly Glu Thr Arg Gly Thr Val His Ser Asp Gly Gly Thr Tyr
100 105 110

Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Val Glu Ala Pro
115 120 125

Ala Ala Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Val Thr Ser
130 135 140

Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Ala Gly
145 150 155 160

Met Asn Met Gly Asn Phe Arg Tyr Tyr Met Ile Asn Ala Thr Glu Gly
165 170 175

Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Val Ser Gly
180 185

<210> 38

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Streptomyces lividans Xyl B

<400> 38

ES 2 377 408 T3

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

180

185

190

<210> 39

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Streptomyces lividans Xyl C

<400> 39

ES 2 377 408 T3

Ala Thr Thr Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asp Gly Met Tyr Tyr
1 5 10 15

Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Gln Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala
35 40 45

Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Asp Gly Asn Val Arg Tyr Asn Gly Tyr
50 55 60

Phe Asn Pro Val Gly Asn Gly Tyr Gly Cys Leu Tyr Gly Trp Thr Ser
65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Ser Tyr Arg
85 90 95

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

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

Lys Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Val Thr Ser
130 135 140

Gly Ser Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
145 150 155 160

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

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

<210> 40

<211> 189

<212> PRT

5 <213> Thermomonospora fusca

<400> 40

ES 2 377 408 T3

Ala Val Thr Ser Asn Glu Thr Gly Tyr His Asp Gly Tyr Phe Tyr Ser
1 5 10 15

Phe Trp Thr Asp Ala Pro Gly Thr Val Ser Met Glu Leu Gly Pro Gly
20 25 30

Gly Asn Tyr Ser Thr Ser Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Ala Thr Gly Gly Arg Arg Thr Val Thr Tyr Ser Ala Ser
50 55 60

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

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

Pro Thr Gly Thr Tyr Met Gly Thr Val Thr Thr Asp Gly Gly Thr Tyr
100 105 110

Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr
115 120 125

Arg Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Arg Thr Ser
130 135 140

Gly Thr Ile Thr Ala Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg His Glu
145 150 155 160

Met His Leu Gly Thr His Asp Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Leu Gly Thr Ser
180 185

<210> 41

<211> 190

<212> PRT

5 <213> Trichoderma harzanium

<400> 41

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

ES 2 377 408 T3

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

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

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

Ser Tyr Asn Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ser Ile Tyr Gly Trp Ser
 65 70 75 80

Arg Asn Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
 100 105 110

Ser Val Tyr Asp Ile Tyr Arg Thr Gln Arg Val Asn Gln Pro Ser Ile
 115 120 125

Ile Gly Thr Ala Thr Phe Tyr Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Asn His
 130 135 140

Arg Ser Ser Gly Ser Val Asn Thr Ala Asn His Phe Asn Ala Trp Ala
 145 150 155 160

Ser His Gly Leu Thr Leu Gly Thr Met Asp Tyr Gln Ile Val Ala Val
 165 170 175

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Ser Ala Ser Ile Thr Val Ser
 180 185 190

<210> 42

<211> 190

<212> PRT

5 <213> Trichoderma viride

<400> 42

Gln Thr Ile Gln 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

ES 2 377 408 T3

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

Ser 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

Ile Gly Thr Ala 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

Gln Gln 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> 43

<211> 178

<212> PRT

5 <213> Trichoderma reesei xilanasa I

<400> 43

ES 2 377 408 T3

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

Tyr Ser Pro Ser Asn Thr Gly Phe Ser Val Asn Trp Asn Thr Gln Asp
 20 25 30

Asp Phe Val Val Gly Val Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ser Ala Pro Ile
 35 40 45

Asn Phe Gly Gly Ser Phe Ser Val Asn Ser Gly Thr Gly Leu Leu Ser
 50 55 60

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

Asp Asn His Asn Tyr Pro Ala Gln Gly Thr Val Lys Gly Thr Val Thr
 85 90 95

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

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

Asn Ser Pro Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gln Asn His Phe Asn
 130 135 140

Ala Trp Ala Ser Leu Gly Leu His Leu Gly Gln Met Asn Tyr Gln Val
 145 150 155 160

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

Ser Asn

<210> 44

<211> 191

<212> PRT

5 <213> Streptomyces lividans xilanasa C

<400> 44

ES 2 377 408 T3

Ala Thr Thr Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asp Gly Met Tyr Tyr
 1 5 10 15

Ser Phe Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ser Val Ser Met Thr Leu Asn Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Tyr Ser Thr Gln Trp Thr Asn Cys Gly Asn Phe Val Ala
 35 40 45

Gly Lys Gly Trp Ser Thr Gly Asp Gly Asn Val Arg Tyr Asn Gly Tyr
 50 55 60

Phe Asn Pro Val Gly Asn Gly Tyr Gly Cys Leu Tyr Gly Trp Thr Ser
 65 70 75 80

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Asn Trp Gly Ser Tyr Arg
 85 90 95

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

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

Lys Thr Phe Gln Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Ser Lys Val Thr Ser
 130 135 140

Gly Ser Gly Thr Ile Thr Thr Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
 145 150 155 160

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

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

Referencias

[0135]

- Arase A., Yomo, T., Urabe, I., Hats, Y., Katsube, Y. and Okada, H. (1993) FEBS Lett. 316:123-127.
- 5 Berka, R.M., Kodama, KH., Rely, M.W., Wison, L.J. and Ward, M. (1991) The development of *Aspergillus niger* var. *awarmori* as a host for the expression and secretion of heterologous gene products: Biochem. Soc. Trans. 19: 681-685.
- Barges, T. and Barreau, C. (1991) Isolation of widine auxotrophs fram *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. Curr. Genet. 19: 359-365.
- 10 Bissett, J. (1984) A revision of the genus *Trichoderma* 1. Section *Longibradriatum* Sent, novo. Can. J. Bot. 62: 924-931.
- Campbell, R. L., Rose, D. R., Sung, W. L., Yagucchi, M. and Wakarchuk, W. (1995) US patent no. 5,405,769 issued on Apr. 11,1995.
- Cannon, P. (1986) International Commission on the Taxonomy of Fungi - (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medial importance, Part 2, Microb. Sci, Vol.3.
- 15 Chen, C.M., Gritzali, M. and Stafford, D.W. (1987) "Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase D from *Trichoderma reesei*", Bio/Technology 5:274-278
- Conesa, A-, Punt, P.J., yan Luijk, N. and van den Hondel, C.A.M.J.J. (2001) The secretion pathway in filamentous fungi: a biotechnological view. Fung, Genet.Biol. 33: 155-171.
- 20 Gkyman, VanMontagu and Herrera-Estrella, (1990) "Transformation of *Trichoderma harzianum* by high-voltage electric pulse", Curr. Genet. 17:169-174
- Gritz, L. and Davies, J. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, Gene 25: 179-188
- Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequences similarities. Biochem. J. 280: 309-316.
- 25 Hui, J.P.M., Lanthier, P., White, T.C., McHugh, S.G., Yaguchi, M., Roy, R., and Thibault, P. (2001) Characterization of cellobiohydrolase I (ce17a) glycoforms from extracts, of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectvic focusing and electrospray mass spectromety. J. Chrom. B. 752: 349~368,
- Hui, J.P.M., White, T.C, and Thibault, P. (2002) Identificafion of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase Ii and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. Glycobiology 12: 837-849.
- 30 Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W. Meyer, W., Petrini, O. Gams. W. Bömer, T. & Kubicek, C.P. (1996) Molecular evidence that the aserual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc, Natl. Acid. Sci. 93: 7755-7760.
- Kulkami, N., Shendye, A. and Rao, M. (1999) Molecular and biotechnical aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 23:411-456
- 35 Lorito, Hayes, DiPietro and Harman 1993, Biolistic Transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. Curr. Genet. 24: 349~356.
- Lüthis E., Jasmat N. B., and Bergopist P. L. (1990) Appl. Environ. Microbiol. 56:2677-2683, Mandels, M. and Reese, E.T. (1957) Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. J. Bactriol. 73: 269-278.
- 40 Mantyla. A., Paloheimo, M., Lantto, R., Fagestrom, R., Lahtinen, T., Suominen, P., and Vehmaanpera, J. (2003) Sequences of Xylanase and Xylanase Expression Vectors. US 6.667,170.
- Montencourt, B. and Eveleigh, D. (1979) Selective isolation of high yielding cellulase mutants of *T. reesei*. Adv. Chem. Ser. 181:289-301.

- Paloheimo, M., Mantyla, A., Kacoio, J. and Suominen, P. (2003) High-yield production of bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7073-7082.
- 5 Paloheimo, M., Hakola, S., Mantyla, A., Vehmaanpera, J., Lantto, R., Lahtinen, T., Fagerstrom, R. B., and Suominen, P. (2001) Xylanases, genes encoding them, and uses thereof. US 6,635,464. Penttila, Nevalainen, Ratto, Salminen and Knowles (1987) A versatile transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. *Gene* 6: 155-164.
- 10 Radford, A., Buston, F.P., Newbury, S.F. and Glazebrook, J.A. (1985) Regulation of pyrimidine metabolism in *Neurospora*. In *Molecular Genetics of Filamentous Fungi* (Timborlake, W.E., editor), Alan R. Liss (New York), pages 127-143.
- Saarelainen, R., Paloheimo, M., Fagersrom, R., Suominen, P.L., and Nevalainen, K.M.H. (1993) Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylana II (pl 9), x1n2. *Mol. Gen. Genet.* 241:497-503.
- 15 Sagt, C.M.J., Kleizen, B., Verwaal, R., deJong, M.D.M., Müller, W.H., Smits, A., Visser, C., Boonstra, J., Verkleij, A.J. and Verrips, C.T. (2000) Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts: *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (11): 4940-494.
- saloheimo, M., Lund, M. and Penttila, M. (1999) The protein disulphide isomerases gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. *Mol. Gen. Genet.* 262: 35-45.
- 20 Sambrook, Fritsch and Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Press.
- Shoemaker, Schweikart, Ladner, Gelfand, Kwok, Myambo and Innis (1983) Molecular cloning of exo-cellobiohydrolase 1 derived from *Trichoderma reesei* strain L27. *Bio/Technology* 1;691-696.
- 25 Simmons, E.G. (1977) Classification of some cellulase-producing *Trichoderma* species. In: Bigelow, H. And Simmons, E. (Eds.), *Second International Mycological Congress, Abstracts, Vol. 2*, University of South Florida, Tampa, FL, 618.
- Simpson, H. D., Haufler, U. R. and Daniel, R. M. (1991) *Biochem. J.* 277: 413-417.
- Sung, W. L., Luk, C. K., Zahab, D. M. and Wakarchuk, W. (1993) *Protein Expression Purif.* 4: 200-206.
- Sung, W. L., Yaguchi, M and Ishikawa, K. (1998) US patent #5,759,84,0, issued on Jun. 2, 1998.
- Sung, W. L., Yaguchi, M and Ishikawa, K. (1999) US patent #5,866,408, issued on Feb. 2, 1999
- 30 Tsai, B., Ye, Y. and Rapoport, t.a. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Reviews Molecular Cell biology* 3; 246-255
- Te'o, V.S.J., Cziferszky, A.E., Bergquist, P.L., and Nevalainen, K.M.H. (2000) Codon optimization of xylanase gene xynB from the thermophilic bacterium *Dictyoglomus thermophilum* for expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *FEMS Microbiol. Letters* 190: 13-19.
- 35 Törrönen, A., Mach, R.L., Messner, R., Gonzal, R., Kalkkinen, N., Harkki, A., and Kubicek, C.P. (1992) The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization of both enzymes and genes. *Bio/technology* 10: 1461-1465.
- Turenen, O., Etuaho, K., Fenel, F., Vehmasper, J., Wu, X. Rouvinen, J., and Leisola, M. (2001) *J. Biotech.* 88:37-46.
- 40 van den Brink, H., Andresen, B., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K., and Harboe, M. (2004) Glycosylation as a tool for improved protein production in *Aspergillus niger*. Abstract for poster VIII p-21, 7th European Conference on Fungal Genetics, Copenhagen (April 17-20, 2004).
- van den Elzen, P.J.M, Townsend, J., Lee, K. Y., Bedbrook, J.R. (1985) A chimaeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Mol. Biol.* 5: 299-302.

Vanhanen, Penttila, Lehtovasra and Knowles (1989) Isolation and characterization of the 3-phosphoglycerate kinase gene (pgk) from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Curr. Genet.* 15: 181-186,1989.

Vanfunen, Saloheimo, Ilmen, K owles and Penttila (1991) Promoter structure and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene (pgk1) of *Trichoderma reesei*. *Gene* 106: 129-133,

5 Viera and Messing (1987) Isolation of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153: 3.

Winterhalter C. and Liebl, W. (1995) *Appl, Environ, Microbiol.* 61: 1810-1815.

REIVINDICACIONES

1. Una xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada que comprende, una secuencia que introduce un sitio de N-glucosilación consensus eucariótico funcional que consiste de la secuencia de aminoácidos Asn-Xaa-Ser/Ihr (N-X-S/T) que no se encuentra de otra forma en la xilanasa de la Familia 11 de la que se deriva la xilanasa de la Familia 11 modificada, el sitio de N-glucosilación producido por la sustitución de un aminoácido (X) en una asparagina (N) en una posición seleccionada del grupo que consiste de la posición 34 (X34N), posición 131 (X131N), posición 180 (X180N), posición 182 (X182N), y una combinación de las mismas, la posición determinada de la alineación de secuencia de la xilanasa de la Familia 11 con la secuencia de aminoácidos de la xilanasa II *Trichoderma reesei* como se define en la SEQ ID NO:1, en donde la xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada, cuando se expresa en una cepa anfitriona *Trichoderma*, exhibe un aumento en la eficiencia de la expresión de por lo menos 40% cuando se compara con la eficiencia de la expresión de la xilanasa de la Familia 11 fúngica correspondiente de la cual se deriva la xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada.
2. La xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada de la Reivindicación 1 que comprende, X131N.
3. La xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada de la Reivindicación 1, en donde la sustitución de aminoácido se selecciona del grupo que consiste de: sustitución en la posición 34 (X34N) y adicionalmente comprende una sustitución para una treonina en la posición 36 (S36T), sustitución en la posición 180 (X180N) y que comprende adicionalmente una sustitución para una treonina en la posición 182 (S182T); sustitución en la posición 182 (X182N) y que comprende adicionalmente una sustitución para una treonina en la posición 184 (S184T); y una combinación de las mismas.
4. La xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada de la Reivindicación 1, en donde la xilanasa de la Familia 11 fúngica es xilanasa 1 o xilanasa 2 de *Trichoderma reesei*.
5. La xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada de la Reivindicación 1, en donde la xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada es *Trichoderma reesei* xilanasa I como se define en la SEQ ID:2 que comprende una sustitución de aminoácido de T131N, la posición se determina de la alineación de secuencia de la Xilanasa 1 de *Trichoderma reesei* con la secuencia de aminoácidos de la xilanasa 11 de *Trichoderma reesei* como se define en la SEQ ID NO:1.
6. Una xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada que comprende una secuencia que introduce un sitio de glucosilación N consensus funcional que no se encuentra de otra forma en la xilanasa de la Familia 11 fúngica de la que se deriva la xilanasa de la Familia 11 modificada, en donde la xilanasa de la Familia 11 modificada se selecciona del grupo que consiste de:
- Xilasa II de *Trichoderma reesei* con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, 1129E, T13N, H144R, N157D, Q161R, Q162H, y T165H,
- Xilasa II de *Trichoderma reesei* con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, 1129E, T131N, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H, y T165H;
- Xilasa II de *Trichoderma reesei* con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, 1129E, H144R, N157D, Q161R, Q161H, T165H y F180N;
- Xilasa II de *Trichoderma reesei* con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, 1129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165H, F180N y S182T;
- Xilasa II de *Trichoderma reesei* con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, 1129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165H y S182N; X
- ilasa II de *Trichoderma reesei* con N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, 1129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165H, S182N y S184T;
- Xilasa II de *Trichoderma reesei* con, N10H, Y27M, N29L, Q34N, S75A, L105H, Q123A, 1129E, H144R, N157D, Q16R, Q162H y T165H; y
- Trichoderma reesei* xilanasa II con N10H, Y27M, N29L, Q34N, S36T, S75A, L10SH, Q125A, 1129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H y T165H.

- 5 7. Una construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada que comprende un promotor ligado operativamente a una señal de secreción que se liga operativamente a una región codificante que codifica una xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada como se define en la reivindicación 1, la construcción génica de xilanasa modificada resulta en un aumento en la expresión, eficiencia de la xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada de por lo menos 40% cuando se compara con la eficiencia de la expresión de una xilanasa de la Familia 11 fúngica correspondiente de la cual se deriva la xilanasa modificada, dicha xilanasa de la Familia 11 fúngica codificada correspondiente de la que se deriva la xilanasa modificada codificada se expresa de una construcción génica que comprende el mismo promotor ligado operativamente y la señal de secreción como dicha construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada.
- 10 8. La construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada de la Reivindicación 7, en donde la señal de secreción es una señal de secreción Trichoderma.
9. La construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada de la Reivindicación 8, en donde la señal de secreción Trichoderma es una la señal de secreción xilanasa.
- 15 10. La construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada de la Reivindicación 9, en donde la señal de secreción xilanasa es una señal de secreción de xilanasa Trichoderma o una Señal de secreción II de xilanasa II Trichoderma.
- 20 11. La construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada de la Reivindicación 7, en donde la región codificante codifica una xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada que se deriva de Xilasa II de Trichoderma reesei como se define en la SEQ ID NO: 1, cuya xilanasa comprende adicionalmente las sustituciones de aminoácido N10H, Y27M, N291, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, y T165R.
12. La construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada de la Reivindicación 7, en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste de un promotor de Trichoderma cbh1, un promotor cbh2, un promotor eg1, un promotor eg2, un promotor eg3, un promotor eg5, un promotor xln1, un promotor xln2, y una combinación de dos o más de dos de estos promotores.
- 25 13. Un microbio genéticamente modificado que comprende la construcción génica de xilanasa de la Familia 11 modificada de una cualquiera de las Reivindicaciones 7 a 12.
14. El microbio genéticamente modificado de la Reivindicación 13, en donde el microbio comprende un miembro del género de Trichoderma o Hypocrea.
- 30 15. Un método para procesar alimentos que comprende, tratar el alimento con la xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6.
16. El método como se define en la Reivindicación 15, en donde el alimento se selecciona del grupo que consiste de un alimento para aves, un alimento para cerdos, un alimento utilizado en panadería, o un alimento utilizado en bebidas.
- 35 17. Un método para fabricación de pulpa que comprende tratar la pulpa con la xilanasa de la Familia 11 modificada de una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6.
18. El uso de la xilanasa de la Familia 11 fúngica modificada en una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 6 en un proceso alimenticio o industrial.
19. El uso como se define en la Reivindicación 18, en donde el proceso industrial es fabricación de pulpa.

ES 2 377 408 T3

Ca	23				S	AFNTQAAP	31
Cs	1					G	1

Tr2#		10	20	30	40		
Bp	1	RTITNNEMGN	HSGYDYELWK	DYGNT-SMTL	NNGGAFSAGY	N--NIGNA	45
Ca	32	KTITSNEIGV	NGGYDYELWK	DYGNT-SMTL	KNGGAFSCQY	S--NIGNA	76
Fs	1	NSSVTGNVG	SSPYHYEIWY	QGG-NNSMTF	YDNGTYKASH	N--GTNDF	44
Cs	2	RIIYDNETGT	HGGYDYELWK	DYGNT-IMEL	NDGGTFSCQY	S--NIGNA	46
Rf	1	SAADQQTRGN	VGGYDYEMWN	QNGQGQASMN	PGAGSFTCSY	S--NIENF	46
Tr2	1	QTIQPGTGY	NNGYFYSYWN	DGHGGVITYN	GPGGQFSVNY	S--NSGNF	45
Tv	1	QTIQPGTGF	NNGYFYSYWN	DGHGGVITYN	GPGGQFSVNY	S--NSGNF	45
Th	1	QTIQPGTGY	SNGYFYSYWN	DGHAGVITYN	GCGGSFTVNY	S--NSGNF	45
Sc	1	SGTPSSSTGT	DGGYYSWWT	DGAGDATYQN	NCGGSYTLTY	SG--NNGNL	46
An	1		S AGINYVQNYN	GNLGDFTY-D	ESAGTFSMYH	EDGVSSDF	38
Ak	1		S AGINYVQNYN	GNLADFTY-D	ESAGTFSMYH	EDGVSSDF	38
At	1		S AGINYVQNYN	GNLGDFTY-D	ESAGTFSMYH	EDGVSSDF	38
Tr1	1		ASINYDQNYQ	TGG-QVSY-	PSNTGFSVNY	N--TQDDF	34
Aa	1	RSTPSSTGE	NNGYYSFWT	DGGGDVITYN	GNAGSYSVEH	S--NVGNF	45
Ss	1	ATTIT-NETGY	D-GMYYSFWT	DGGGSVSMTL	NCGGSYSTRY	T--NCGNF	45
SlB	1	DTVVTINQEGT	NNGYYSFWT	DSQGTVSMNM	GSGGQYSTSY	R--NTGNF	47
SlC	1	ATTITTNQTGT	D-GMYYSFWT	DGGGSVSMTL	NCGGSYSTQH	T--NCGNF	46
Tl	1	QTFPNSSEGW	HDGYYSWWS	DGGAQATYTN	LEGGTYEISY	G--DCGNL	45
Tf	1	AVTSNETGY	HDGYYSFWT	DAPGTVMEL	GPCGNYSTSY	R--NTGNF	45
Bc	1		ASTDYWQNW	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNY	S--NTGNF	36
Bs	1		ASTDYWQNW	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNY	S--NTGNF	36

FIGURA 1

ES 2 377 408 T3

Tr2#		50		60		70		80	
Bp	46	LFRK-GKKFD	ST-RTHHQLG	NISINYNASF	N-PGGNSYLC	VYGH	TQSP	90	
Ca	77	LFRK-GKKFN	DT-QTYKQLG	NISVNYNCNY	Q-PYGNSYLC	VYGH	TSSP	121	
FS	45	LARV-GFKYD	EK-HTYEELGP	IDAYYKWSKQ	GSAGGYNYIG	IYGH	TVDP	91	
Cs	47	LFRK-GRKFN	SD-KTYQELG	DIVVEYGCDY	N-PNGNSYLC	VYGH	TRNP	91	
Rf	47	LARM-GKNYD	SQKKNYKAFG	NIVLTYDVEY	T-PRGNSYMC	VYGH	TRNP	92	
Tr2	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNNGNSYLS	VYGH	SRNP	83	
Tv	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GT	YNPNNGNSYLS	VYGH	SRNP	83	
Th	46	VGGK-GWQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNNGNSYLS	IYGH	SRNP	83	
Sc	47	VGGK-GWNPG	AASRS-----	---ISYS-GT	YQPNNGNSYLS	VYGH	TRSS	84	
An	39	VVGL-GWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSSSYLA	VYGH	VNYP	77	
Ak	39	VVGL-GWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSSSYLA	VYGH	VNYP	77	
At	39	VVGL-GWTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSASYLA	VYGH	VNYP	77	
Tr1	35	VGV-GWTTG	SSAP-----	---INFGGSF	SVNSGTGLLS	VYGH	STNP	72	
Aa	46	VGGK-GWNPG	SAKD-----	---ITYSGNF	T-PSGNGYLS	VYGH	TDP	83	
Ss	46	VAGK-GWANG	GR-RT-----	---VRYT-GW	FNPSCNGYGC	LYGH	TSNP	82	
SlB	48	VAGK-GWANG	GR-RT-----	---VOYS-GS	FNPSCNAYLA	LYGH	TSNP	84	
SlC	47	VAGK-GWSTG	DGN-----	---VRYN-GY	FNPVGNAYGC	LYGH	TSNP	82	
Tl	46	VGGK-GWNPG	LNARA-----	---IHFE-GV	YQPNNGNSYLA	VYGH	TRNP	83	
Tf	46	VAGK-GWATG	GR-RT-----	---VTYS-AS	FNPSCNAYLT	LYGH	TRNP	82	
Bc	37	VVVK-GWTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNNGNYLT	LYGH	TRSP	75	
Bs	37	VVVK-GWTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNNGNYLT	LYGH	TRSP	75	
Tr2#		90		100		110		120	
Bp	91	LAEXYIVDSW	GTYSR-PT--G	AYKGSFYADG	GTXYDIYETTR	VNOPS	IIG	135	
Ca	122	LVEXYIVDSW	GSWRPP--GG	TSKGTITVDG	GIYDIYETTR	INOPS	IIG	167	
Fs	92	LVEXYIVDDW	FNKPGANLLG	QRKGEFTVDG	DTYDIYQNTTR	VQOPS	IIG	139	
Cs	92	LVEXYIVESW	GSWRPP--GA	TPKGTITQWMAG	TYEIIYETTR	VNOPS	IDG	138	
Rf	93	LMEXYIVEGW	GDWRPPGNDG	EVKGTVSANG	NTYDIKRTMR	YNOPS	LDG	140	
Tr2	84	LIEXYIVENF	GTYN-PSTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTOR	VNOPS	IIG	130	
Tv	84	LIEXYIVENF	GTYN-PSTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTOR	VNOPS	IIG	130	
Th	84	LIEXYIVENF	GTYN-PSTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTOR	VNOPS	IIG	130	
Sc	85	LIEXYIVESY	GSYD-PSSAA	SHKGSVTCNG	ATYDILSTWR	YNAPS	IDG	131	
An	78	GAEXYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYS DG	STYQVCTDTR	TNEPS	ITG	124	
Ak	78	QAEXYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYS DG	STYQVCTDTR	TNEPS	ITG	124	
At	78	QAEXYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYS DG	STYQVCTDTR	TNEPS	ITG	124	
Tr1	73	LVEXYIMEDN	HNY--PAQ-G	TVKGTVTS DG	ATYTIWENTR	VNEPS	IIG	117	
Aa	84	LIEXYIVESY	GDYN-PGSGG	TTKGNVSS DG	SVYDIYATATR	TNAPS	IIG	130	
Ss	83	LVEXYIVDNW	GSYR-PT--G	ETRGTVHS DG	GTXYDIYKTR	YNAPS	VEA	127	
SlB	85	LVEXYIVDNW	GTYSR-PT--G	EYKGTVTS DG	GTXYDIYKTR	VNKPS	VEG	129	
SlC	83	LVEXYIVDNW	GSYR-PT--G	TYKGTVSS DG	GTXYDIYKTR	YNAPS	VEG	127	
Tl	84	LVEXYIVENF	GTYSR-PT--G	TDLGTVECDG	SIYRLGKTR	VNAPS	IDG	130	
Tf	83	LVEXYIVESW	GTYSR-PT--G	TYMGTVTT DG	GTXYDIYKTR	YNAPS	IEG	127	
Bc	76	LIEXYIVDSW	GTYSR-PT--G	TYKGTVKS DG	GTXYDIYKTR	YNAPS	IDG	120	
Bs	76	LIEXYIVDSW	GTYSR-PT--G	TYKGTVKS DG	GTXYDIYKTR	YNAPS	IDG	120	

FIGURA 1 CONT.

Tr2#	140	150	160
Bp 136	-IATFKQYWS VRQTKRST--	-----GTVS	VSAHFRKWHES LGMPM-GK 174
Ca 168	-NTTFKQYWS VRRTKRST--	-----GTIS	VSKHFAAWES KGMPL-GK 206
Fs 140	-TQTFQYFS VRKSARSC--	-----CHID	ITAHMKKHEE LGMKM-GK 178
Cs 139	-TATFQYWS VRTSKRST--	-----GTIS	VTEHFKQWER MCMRM-GK 177
Rf 141	-TATFQYWS VRQTSGSANN	QTNMKG	GTID VTKHFDAYSA AGLDMSGT 187
Tr2 131	-TATFYQYWS VRNRHR-S-S	-----GSVN	TANHFNAWAQ OGLTL-GT 168
Tv 131	-TSTFYQYWS VRNRHR-S-S	-----GSVN	TANHFNAWAQ OGLTL-GT 168
Th 131	-TATFYQYWS VRNRHR-S-S	-----GSVN	TANHFNAWAH HGLTL-GT 168
Sc 132	-TQTFEQFWS VRNPCKAPGG	SIS---	GTVD VQCHFDAYKG LGMNLGSE 175
An 125	-TSTFQYFS VRESTRST--	-----GTVT	VANHFNFYHAQ HGFGN-SD 163
Ak 125	-TSTFQYFS VRESTRST--	-----GTVT	VANHFNFYHAQ HGFGN-SD 163
At 125	-TSTFQYFS VRESTRST--	-----GTVT	VANHFNFYHAH HGFGN-SD 163
Tr1 118	-TATNQYIS VRNSPR-T-S	-----GTVT	VQNHFNAWAS LGLHLGQM 155
Aa 131	-TATFSQYWS VRQNKR-VG-	-----GTVT	TSNHFNAWAK LGMNL-GT 168
Ss 128	-PAAFDQYWS VRQSKVT--S	-----GTIT	TGNHFDAYAR AGMNMGNF 168
SlB 130	TR-TFDQYWS VRQSKR-TG-	-----GTIT	TGNHFDAYAR AGMPLGNF 168
SlC 128	TK-TFDQYWS VRQSKVTSGS	-----GTIT	TGNHFDAYAR AGMNMVQF 168
Tl 131	TQ-TFDQYWS VRQDKR-T-S	-----GTVQ	TGCHFDAYAR AGLNVNGD 169
Tf 128	TR-TFDQYWS VRQSKRST--	-----GTIT	AGNHFDAYAR HGMHLGTH 166
Bc 121	DRTTFQYWS VRQSKRPTGS	N-----ATIT	FTNHVNAWKS HGMNLGSN 163
Bs 121	DRTTFQYWS VRQSKRPTGS	N-----ATIT	FSNHVNAWKS HGMNLGSN 163

Tr2#	170	180	190
Bp 175	MYETAFTVEG YQSSGSANVM	TNQLFIGN	201
Ca 207	MHETAFNIEG YQSSGKADV	SMSINIGK	233
Fs 179	MYEAKVLVEA GGGSGSFDV-	TYFKMT	203.
Cs 178	MYEVALTVEG YQSSGYANVY	KNEIRIGANP....	
Rf 188	LYEVSLNIEG YRNSGSANVK	SVSV	211
Tr2 169	MDYQIVAVEG YFSSGSASI-	TVS	190
Tv 169	MDYQIVAVEG YFSSGSASI-	TVS	190
Th 169	MDYQIVAVEG YFSSGSASI-	TVS	190
Sc 176	HNYQIVATEG YQSSGTATI-	TVT	197
An 164	FNYQVMAVEA WSGAGSASV-	TISS	185
Ak 164	FNYQVMAVEA WSGAGSASV-	TISS	185
At 164	FNYQVMAVEA WSGAGSASV-	TISS	185
Tr1 157	-NYQVVAVEG WGGSGSASQ-	SVSN	178
Aa 169	HNYQILATEG YQSSGSSSI-	TIQ	190
Ss 167	RYYMINATEG YQSSGSSTI-	TVSG	189
SlB 169	SYYMIMATEG YQSSGSSSI-	NVGG.....	
SlC 169	RYYMIMATEG YQSSGSSNI-	TVSG	191
Tl 170	HYYQIVATEG YFSSGYARI-	TVADVG	194
Tf 167	D-YMIMATEG YQSSGSSNVT	LGTS.....	
Bc 164	WAYQVMATEG YQSSGSSNV-	TVW	185
Bs 164	WAYQVMATEG YQSSGSSNV-	TVW	185

FIGURA 1 CONT.

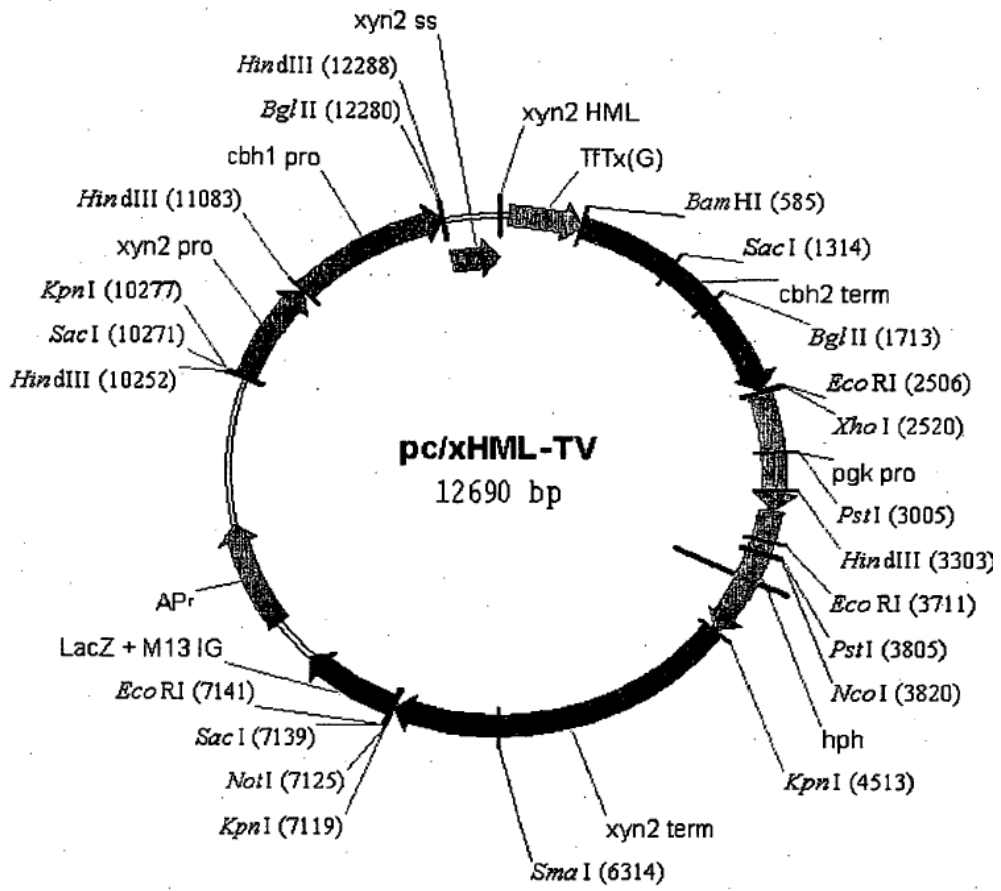


Figura 2

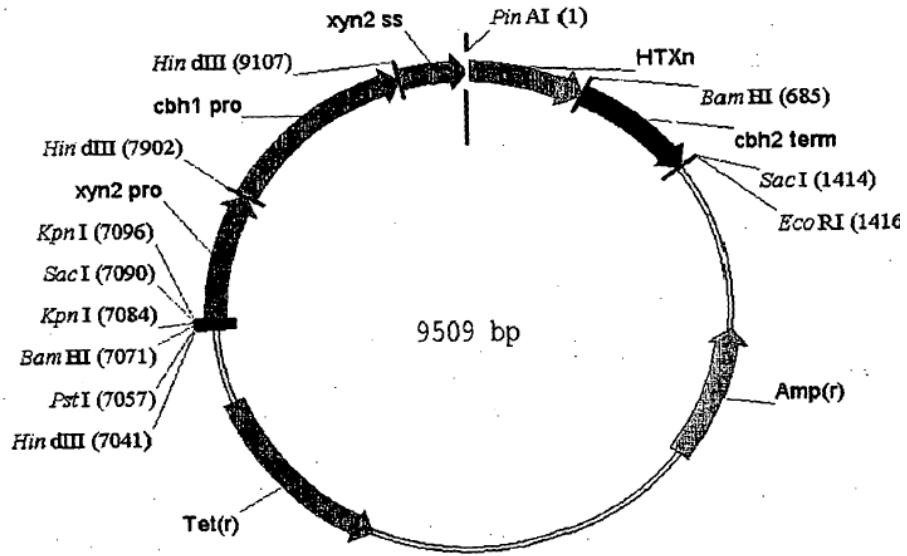


Figura 3

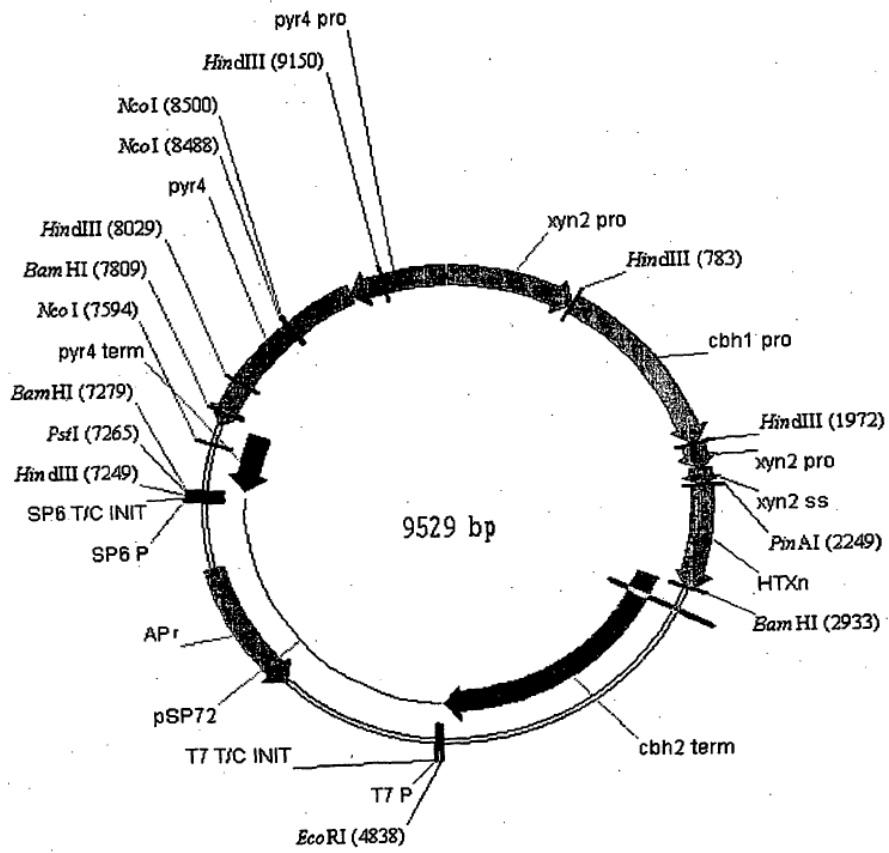


Figura 4

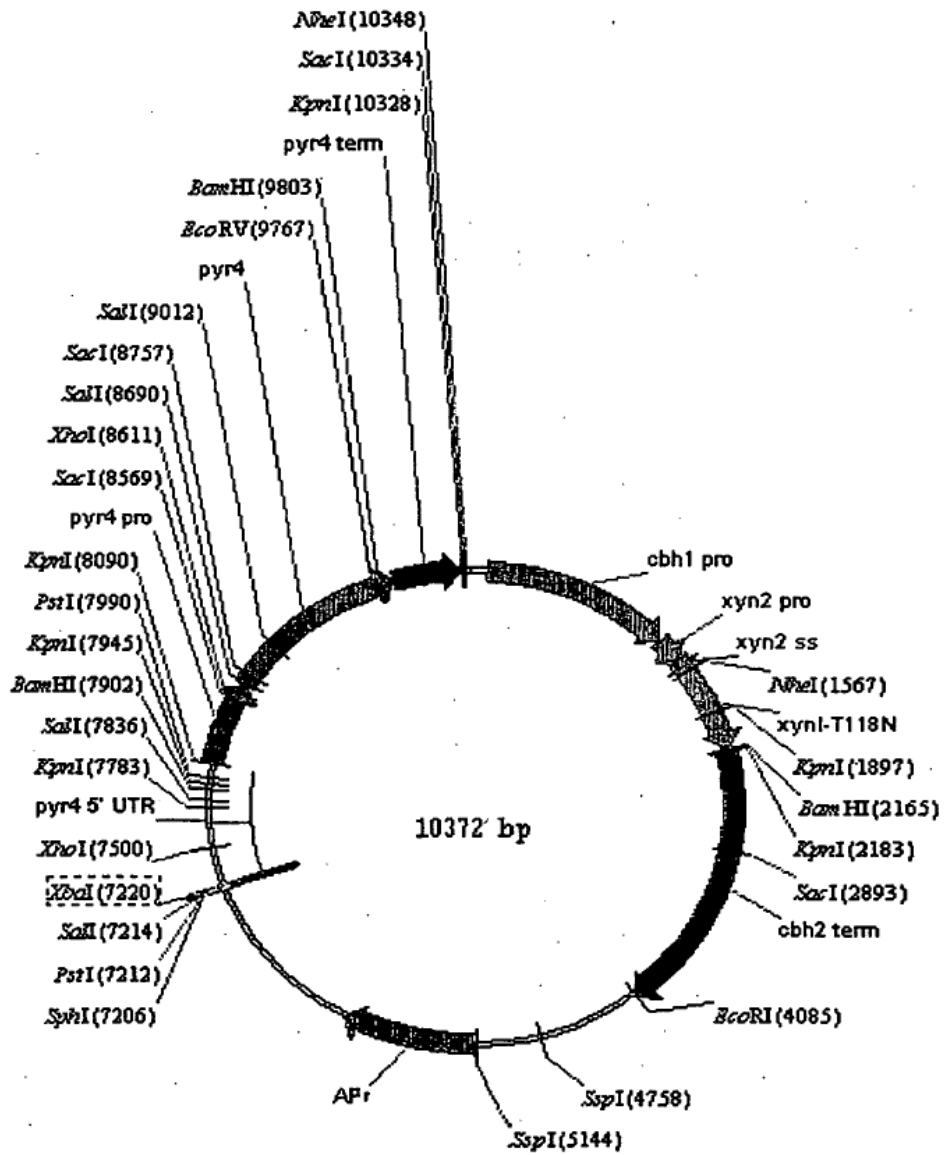


Figura 5A

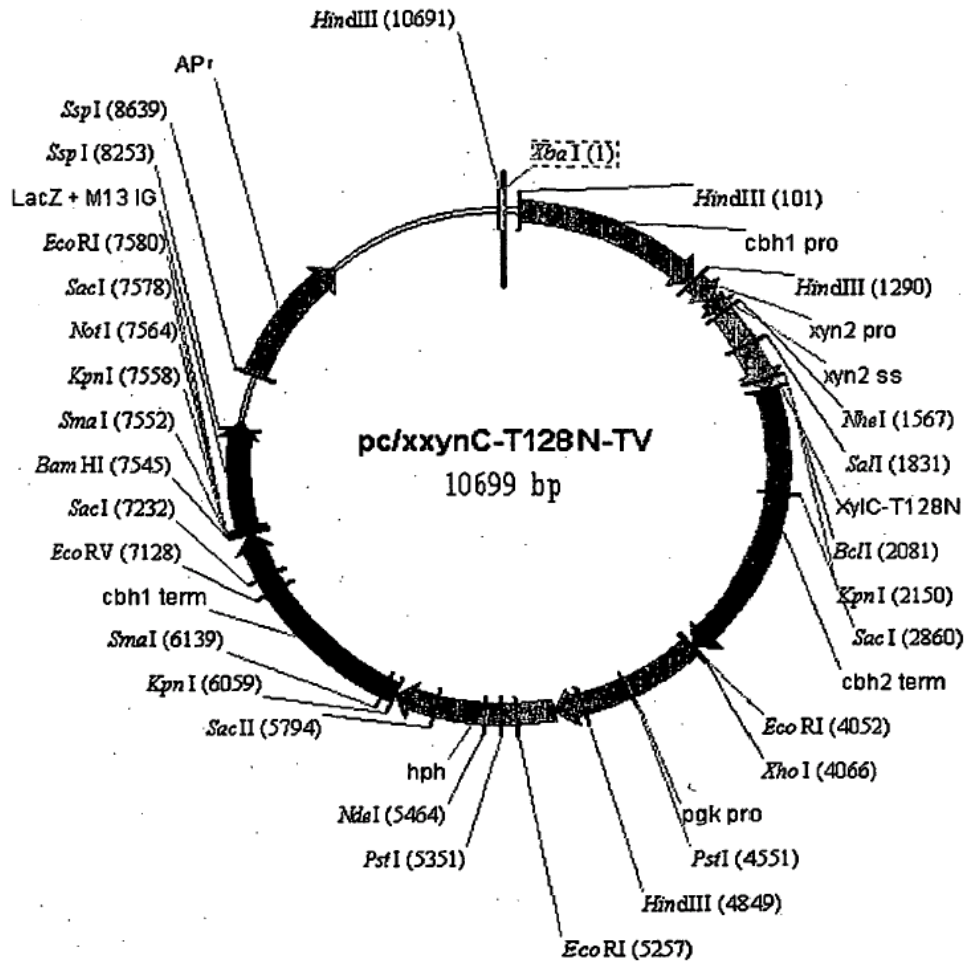


Figura 5B

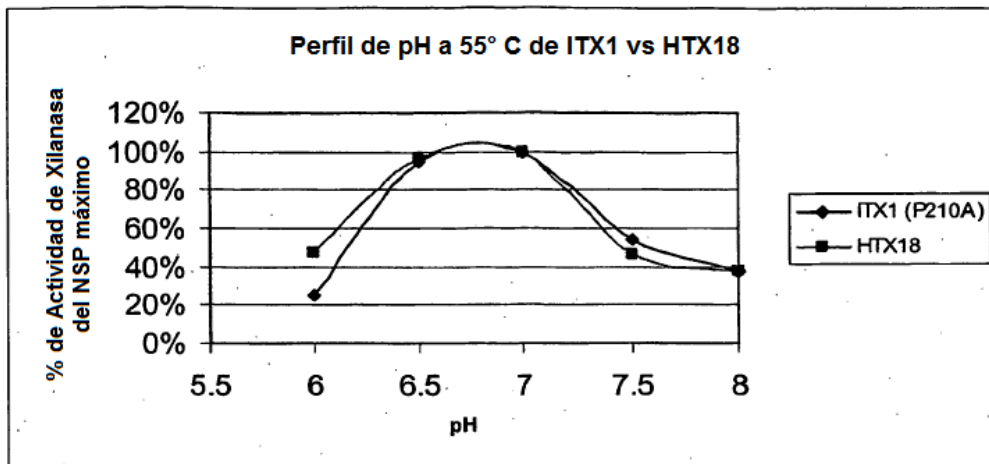


Figura 6

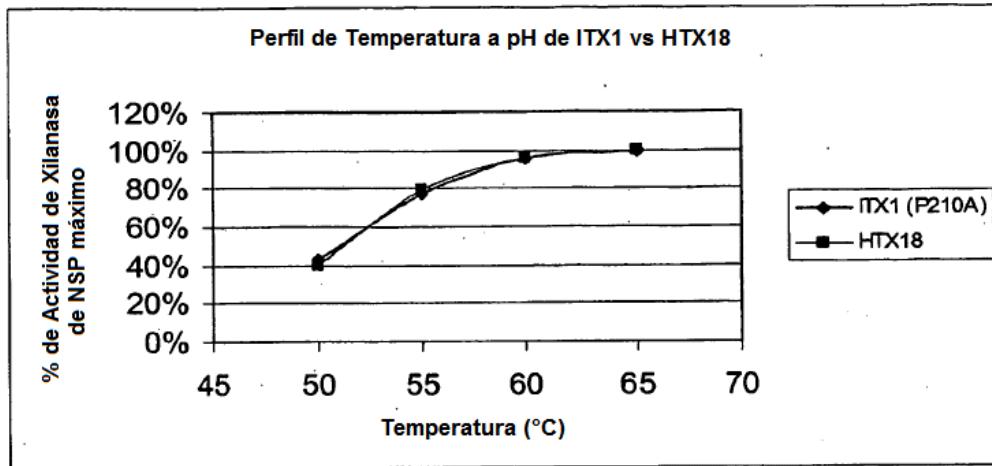


Figura 7