



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(19) **RU** (11) **2 394 909** (13) **C2**

(51) МПК

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

A23L 1/03 (2006.01)

D21H 17/22 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2006137673/13**, **24.03.2005**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.03.2005

(30) Конвенционный приоритет:
25.03.2004 US 60/556,061

(43) Дата публикации заявки: **27.04.2008**

(45) Опубликовано: **20.07.2010** Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2291901**, **20.08.2004**. **RU 2201689**, **10.04.2003**. **RU 2201690**, **10.04.2003**. **RU 2117703**, **20.08.1998**. **RU 2261910**, **06.05.1999**. **RU 2211242**, **27.08.2003**. **WO 9534662**, **21.12.1995**. **WO 9527779**, **19.10.1995**. **US 5405769**, **11.04.1995**. **US 6939704**, **06.09.2005**. **CN 1451753**, **29.10.2003**. **JP 10-179155**, **07.07.1998**. **US 2002/0115181**, **22.08.2002**. **PALONEIMO M. ET AL.**: (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **25.10.2006**

(86) Заявка РСТ:
CA 2005/000448 (24.03.2005)

(87) Публикация РСТ:
WO 2005/093072 (06.10.2005)

Адрес для переписки:
119034, Москва, Пречистенский пер., 14, стр.1, 4-й этаж, Гоулингз Интернэшнл Инк, пат.лов. В.Н.Дементьеву, рег.№ 1

(72) Автор(ы):

**УАЙТ Тереза (СА),
ДЖИРУ Дженьевьев Р. (СА),
УОЛЛЕС Кэти Е. А. (СА)**

(73) Патентообладатель(и):

**АЙОДЖЕН БИО-ПРОДАКТС
КОРПОРЕЙШН (СА)**

(54) МОДИФИЦИРОВАННАЯ КСИЛАНАЗА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к модифицированной ксиланазе 11-го Семейства. Предложенная ксиланаза содержит последовательность функционального консенсусного сайта гликозилирования. Неограничивающие примеры вводимых сайтов гликозилирования включают замену аминокислоты в положении (34, 131, 180, 182),

или в их комбинации, на аспарагин. Указанное положение аминокислоты в ксиланазе 11-го Семейства определяют выравниванием последовательности, представляющей интерес ксиланазы с аминокислотной последовательностью ксиланазы II *Trichoderma reesei*. Введенный консенсусный сайт гликозилирования обеспечивает повышенную эффективность экспрессии модифицированной

ксилаказы по сравнению с эффективностью экспрессии не модифицированной ксиланазы при использовании аналогичных штаммов-хозяев и

условий выращивания. 7 н. и 11 з.п. ф-лы, 7 ил., 4 табл.

(56) (продолжение):

"High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure", Applied and environmental microbiology, 2003, v.69, n.12 p.7073-7082. WO 03106654, 24.12.2003. WO 0142433, 14.06.2001.

R U 2 3 9 4 9 0 9 C 2

R U 2 3 9 4 9 0 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12N 9/24 (2006.01)*C12N* 15/56 (2006.01)*C12N* 1/15 (2006.01)*A23K* 1/165 (2006.01)*A23L* 1/03 (2006.01)*D21H* 17/22 (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2006137673/13, 24.03.2005**(24) Effective date for property rights:
24.03.2005(30) Priority:
25.03.2004 US 60/556,061(43) Application published: **27.04.2008**(45) Date of publication: **20.07.2010 Bull. 20**(85) Commencement of national phase: **25.10.2006**(86) PCT application:
CA 2005/000448 (24.03.2005)(87) PCT publication:
WO 2005/093072 (06.10.2005)

Mail address:
**119034, Moskva, Prechistenskij per., 14, str.1, 4-j
ehtazh, Goulingz Internehshnl Ink, pat.pov.
V.N.Dement'evu, reg.№ 1**

(72) Inventor(s):

**UAJT Tereza (CA),
DZhIRU Dzhenev'ev R. (CA),
UOLLES Kehti E. A. (CA)**

(73) Proprietor(s):

**AJODZHEN BIO-PRODAKTS KORPOREJShN
(CA)**

(54) **MODIFIED XYLANASE**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: xylanase contains a sequence of a functional glycosylation consensus site. Non-limiting examples of glycosylation sites include substitution of the amino acid in position (34, 131, 180, 182), or in their combination with asparagine. The said amino acid position in xylanase of the 11th family is

determined by leveling the xylanase sequence of interest with an amino acid sequence of xylanase II *Trichoderma reesei*.

EFFECT: more efficient expression of modified xylanase compared with efficiency of expression of non-modified xylanase when using similar host strains and culturing conditions.

18 cl, 7 dwg, 4 tbl, 12 ex

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Настоящее изобретение относится к ксиланазам с повышенной экспрессией, более конкретно, к повышенной экспрессии и секреции ксиланаз хозяином.

5

Предпосылки создания изобретения

Ксиланазы, продуцируемые многими видами грибов - гифомицетов и бактерий, представляют собой группу ферментов, имеющих широкое промышленное значение. Основным применением ксиланаз является применение для биоотбеливания пульпы при производстве бумаги. Кроме того, ксиланазы применяются в качестве осветлителей соков и вин, ферментативных агентов при промывке точных устройств и полупроводников, их также используют для повышения усвояемости кормов для птиц и свиней.

15

Большинство ксиланаз для промышленного применения является представителями 11-го Семейства, проявляющими разнообразные биохимические и биофизические свойства. Например, термостабильные ксиланазы были выделены из бактерий (патент США 6667170), грибов (патент США 6635464) или других экстремальных термофилов (Lüthi et al. 1990; Winterhalter et al. 1995; Simpson et al. 1991). Или же, параметры ксиланаз оптимизируют для различного применения в промышленности, изменяя белок методом рекомбинантной ДНК (например, патенты США 5759840; 5866408; 5405769; и Turunen et al., 2001).

20

25

Успешное использование ксиланазных ферментов в промышленности требует рентабельного получения с применением микроорганизма-хозяина, который секретирует ксиланазу в культуральный бульон в процессе глубинной ферментации. Это особенно необходимо для крупномасштабного получения ксиланаз из термофилов или экстремальных термофилов, которые трудно культивировать или которые не секретируют белки с достаточно высокими уровнями. Обычно микроорганизм-хозяин для промышленного получения ферментов представляет собой гриб-гифомицет, такой как *Trichoderma*, *Aspergellus* или *Fusarium*, актиномицет, такой как *Streptomyces* или вид бактерий *Bacillus*. Это означает, что гены, кодирующие целевую ксиланазу, либо выделенную из другого организма, либо из белка, созданного методом рекомбинантной ДНК с помощью гена ксиланазы организма-хозяина, нужно клонировать в хозяина-продуцент таким образом, чтобы ген был функционально связан с последовательностями ДНК, которые облегчают его экспрессию и секрецию хозяином.

30

35

40

45

Экспрессия и секреция экзогенных белков с помощью генетической модификации промышленных штаммов *T. reesei* многие годы остаётся сложной задачей (Conesa et al.,

50

2001). Экспрессия гетерологичных белков в *T. reesei* выявляет отклик неструктурированных белков (UPR; Saloheimo et al., 1999), который возникает в результате аккумуляции развёрнутых или неправильно свёрнутых образующихся полипептидов в просвете эндоплазматического ретикулума (ER). Из-за ограниченной имеющейся в настоящее время информации о механизмах регуляции скручивания и секреции ксиланаз 11-го Семейства из *T. reesei* реализовано несколько стратегий для того, чтобы упростить достижение высокого уровня экспрессии родственных экзогенных ксиланаз в штаммах хозяина *T. reesei*. Эти стратегии включают применение сильных индуцибельных промоторов, таких как промоторы генов целлюлазы *T. reesei*, и замену нативных генов целлюлазы конструкциями экспрессии ксиланазы, содержащими сильные индуцибельные промоторы.

Экспрессия бактериальных ксиланаз при использовании *T. reesei* может потребовать гибридизации (слияния) ксиланазы с носителем- полипептидом *T. reesei* с интактной структурой домена, такой как каталитическое ядро связывающих доменов маннаназы I или СВН II белков *T. reesei* (Paloheimo, et al., 2003). Эта стратегия, самостоятельно или в комбинации с делецией одного или более целлюлазных генов *T. reesei* штамма-хозяина, раскрывается в патентах США 6635464 и 6667170 для направления экспрессии ксиланаз 11-го Семейства из источников как бактериального (*A. flexuosa*), так и грибкового (*C. thermophilus*) происхождения. Хотя полипептид- носитель, несомненно, повышает продуцирование и секрецию гетерологичных ксиланаз, описанных в патентах США 6635464 и 6667170, при использовании *T. reesei* штаммов- хозяев, для промышленного применения не всегда желательно, чтобы полипептид- носитель был связан с ферментом ксиланазой. В этих случаях полипептид- носитель следует удалить протеолизом после секреции гибридного белка в культуральный бульон и перед его использованием. Однако, протеолиз увеличивает как время, так и общую стоимость получения целевой ксиланазы вследствие стоимости и времени инкубации, требующихся на самой стадии протеолиза, а также вследствие потерь целевой ксиланазы при протеолитическом удалении носителя- полипептида.

Эта стратегия применения гибридизации целевого белка с белком- носителем, нативным для клетки-хозяина, также успешно использована для повышения продуцирования и секреции химозина млекопитающего из *Aspergillus* (Van den Brink et al., Международные заявки WO 02/36752 и WO 03/106484). В WO 03/106484 раскрываются дальнейшие усовершенствования продуцирования и секреции гибридных белков глюкоамилаза- химозин из *Aspergillus* путём введения мотива N-гликозилирования в искусственный линкерный полипептид между партнёрами по

слиянию- химозином и глюкоамилазой, или внутри пептидной последовательности химозина. Однако, там не показано преимуществ для получения химозина из *Aspergillus* при введении мотива гликозилирования в конструкцию, не содержащую партнёра для слияния.

Sagt *et al.* (2000) сообщают об увеличении секреции целевого белка гетерологичным эукариотическим хозяином при введении мотива N-гликозилирования в нацеленный белок. В данном сообщении введение сайта N-гликозилирования в последовательность гидрофобного мутанта либо грибкового фермента кутиназы, либо фрагментов нативного антитела лам привело к повышенной секреции целевого белка клетками дрожжей- хозяев *Saccharomyces* из *Pichia*. Однако, введение сайта гликозилирования в нативный грибковый фермент кутиназу не привела ни к какому повышению экспрессии при использовании гетерологичных дрожжей- хозяев.

В Международной заявке WO 02/02597 сообщается о продуцировании полипептидов субъединицы FSH-альфа и глюкоцеребозидазы, содержащих сайт гликозилирования. Целью этих исследований было повысить устойчивость экспрессии этих полипептидов. Однако, применимость этого метода продемонстрирована скорее добавлением коротких нуклеотидных последовательностей, кодирующих мотив N-гликозилирования, нежели непосредственной модификацией последовательности первичного пептида.

Целью настоящего изобретения является получить модифицированные ксиланазы, проявляющие повышенную экспрессию.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к ксиланазам с повышенной экспрессией, более конкретно, к повышенной экспрессии и секреции ксиланаз клетками хозяина.

Настоящее изобретение включает модифицированную ксиланазу 11-го Семейства, последовательность, которая вводит функциональный консенсусный сайт N-гликозилирования, отсутствующий в ксиланазе 11-го Семейства, из которой образована модифицированная ксиланаз 11-го Семейства. Модифицированная ксиланаз 11-го Семейства может содержать аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящем из положения 34 (X34N), положения 131 (X131N), положения 180 (X180N), положения 182 (X182N), их комбинации, на аспарагин, положение определено при выравнивании последовательностей ксиланазы 11-го Семейства с аминокислотной последовательностью ксиланазы II *Trichoderma reesei*, определённой в SEQ ID NO: 1. Настоящее изобретение относится к модифицированной ксиланазе 11-го Семейства, как

описано выше, которая дополнительно содержит аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из положения 34 (X34N), положения 131 (X131N), положения 180 (X180N), положения 182 (X182N) и их комбинации, на треонин.

Предпочтительно, модифицированная ксиланаза 11-го семейства содержат мутацию X131N. Также охватывается модифицированная ксиланаза 11-го Семейства, выбранная из группы, состоящей из: ITX1, ITX2, ITX3, ITX3', ITX4, ITX4', ITX5, ITX5', Xln1- 131N и *S. lividans* xlnC- 131N.

Настоящее изобретение относится к модифицированной ксиланазе 11-го Семейства, описанного выше, отличающейся тем, что при экспрессии в клетках- хозяевах штамма *Trichoderma* модифицированная ксиланаза проявляет эффективность экспрессии, повышенную, по сравнению с эффективностью экспрессии ксиланазы 11-го Семейства, из которого получена модифицированная ксиланаза, по меньшей мере, примерно, на 40%.

Настоящее изобретение также включает генетическую конструкцию модифицированной ксиланазы 11-го Семейства, содержащую промотор, функционально связанный с сигналом секреции, функционально связанным с кодирующей областью, причём кодирующая область содержит функциональный консенсусный сайт N-гликозилирования, который, в ином случае, не обнаруживается в ксиланазе 11-го Семейства, из которой образована модифицированная ксиланаза 11-го Семейства, при этом генетическая конструкция модифицированной ксиланазы приводит к повышению эффективности экспрессии кодирующей модифицированной ксиланазы по сравнению с эффективностью экспрессии кодирующей ксиланазы 11-го семейства, из которой образована кодирующая модифицированная ксиланаза.

Кроме того, охватывается генетически модифицированный микроорганизм, содержащий модифицированную генетическую конструкцию ксиланазы 11-го Семейства по данному описанию. Предпочтительно, генетически модифицированный микроорганизм содержит член рода *Trichoderma* или *Hypocrea*. Кроме того, генетически модифицированный микроорганизм содержит сигнал секреции, который представляет собой сигнал секреции *Trichoderma*, например, сигнал секреции ксиланазы *Trichoderma*.

Настоящее изобретение также относится к генетически модифицированному микроорганизму, содержащему кодирующую область, которая кодирует модифицированную ксиланазу из группы, состоящей из: ITX1, ITX2, ITX3, ITX3', ITX4, ITX4', ITX5, ITX5', Xln1- 131N и *S. lividans* xlnC- 131N.

Настоящее изобретение охватывает способ переработки пищевых и кормовых продуктов, включающий обработку пищевого или кормового продукта добавкой, содержащей модифицированную ксиланазу 11-го Семейства, включающей

последовательность, которая вводит функциональный консенсусный сайт N-гликозилирования, который в ином случае не обнаруживается в ксиланазе 11-го Семейства, из которой образована модифицированная ксиланаз 11-го Семейства.

Например, пищевую или кормовую добавку можно выбирать из группы, состоящей из кормовой добавки для птиц, кормовой добавки для свиней, пищевой добавки для хлебопечения или пищевой добавки, используемой в пивоварении.

Настоящее изобретение относится также к способу производства бумажной пульпы, заключающемуся в обработке пульпы модифицированной ксиланазой 11-го семейства, содержащей последовательность, которая вводит функциональный консенсусный сайт N-гликозилирования, который не обнаруживается в ксиланазе 11-го Семейства, из которой образована модифицированная ксиланаз 11-го Семейства.

Настоящее изобретение относится к применению модифицированной ксиланазы, содержащей последовательность, которая вводит функциональный консенсусный сайт N-гликозилирования, который не обнаруживается в ксиланазе 11-го Семейства, из которой образована модифицированная ксиланаз 11-го Семейства, в промышленном процессе или в производстве пищи или кормов. Промышленный процесс может представлять производство бумажной пульпы.

Настоящее изобретение включает модифицированные ксиланазы 11-го Семейства с повышенной экспрессией и секрецией хозяином *Trichoderma* без какого-либо видимого изменения биохимических свойств фермента. Результирующее повышение продуцирования специфической ксиланазы и общей производительности штамма делает экономически целесообразным производство продуктов ксиланазы 11-го Семейства для промышленного применения. Кроме того, в вариантах изобретения сайты N-гликозилирования можно вводить в области гомологии консервативных последовательностей в начале, середине или конце последовательности пептида 11-го Семейства. Это достигается без какого-либо вредного воздействия на функцию ксиланазы.

Краткое описание фигур

Эти и другие признаки изобретения станут более очевидны из нижеприведённого описания, в котором даётся ссылка на прилагаемые фигуры, где:

На **Фигуре 1** изображено выравнивание аминокислотных последовательностей ксиланаз 11-го Семейства с нумерацией с N-конца, где Bp – *Bacillus pumilus* (SEQ ID NO: 31); Ca – *Cloastridium acetobutylicum* P262 xynB (SEQ ID NO: 33); Cs – *Cloastridium stercorarium* xynA₂ (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 - *Aspergillus tubingensis* (SEQ ID NO:29); Tr1 - *Trichoderma reesei* xyn1 (SEQ ID NO:2); Aa - *Aspergillus awamori* var. *kawachi* Xyn B (SEQ ID NO:28); Fs - *Fibrobacter succinogenes* 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* xynC (SEQ ID NO:39); T1 - *Thermomyces lanuginosa* Xyn (SEQ ID NO:45); Tf - *Thermomonospora fusca* TfxA (SEQ ID NO:40); Be - *Bacillus circulans* (SEQ ID NO:30); Bs - *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO:32);

На **Фигуре 2** изображён вектор pC/XHML- TV, применяемый для направления экспрессии модифицированной ксиланазы в *T. reesei*.

На **Фигуре 3** изображена карта вектора общего назначения для мутагенеза pALT-H(I)TX_n, где "n" обозначает дескриптор, например, "13" или "18", а вектор может содержать мутацию 131N (т.е., pALT- ITX_n), или вектор может не содержать мутацию 131N (т.е., pALT- HTX_n). Например, когда "n" обозначает 18, и вектор не содержит мутацию 131N, вектор представляет собой pALT- HTX18.

На **Фигуре 4** показана карта вектора общего назначения pс/xH(I)TX_n- TV, применяемый для направления экспрессии модифицированной ксиланазы в *T. reesei*, где "n" обозначает дескриптор, например, "13", "18", "18(R135Y)" или "1(N131Q)", а вектор может содержать мутацию 131N (т.е., pс/xITX_n- TV), или вектор может не содержать мутацию 131N (т.е., pс/xHTX_n- TV). Например, когда "n" обозначает 18, и вектор не содержит мутацию 131N, вектор представляет собой pс/XITX_n- TV.

На **Фигуре 5** изображена карта векторов, применяемых для направления экспрессии нативной (и модифицированной) *T. reesei* ксиланазы I и *S. lividans* ксиланазы C, соответственно, в *T. reesei*. Фигура 5A: pс/xXYN1- (T118N)- TV; Фигура 5B: pс/xXYLC- (T128N)- TV

На **Фигуре 6** изображены графики зависимости активности от pH для модифицированной ксиланазы ITX1 и её модифицированного аналога HTX18.

На **Фигуре 7** изображены графики зависимости активности от температуры для модифицированной ксиланазы ITX1 и её модифицированного аналога HTX18.

Описание предпочтительного варианта изобретения

Настоящее изобретение относится к ксиланазам с повышенной экспрессией, более конкретно, к повышенной экспрессии и секреции ксиланаз хозяином.

Ниже дано описание предпочтительного варианта изобретения. Ксиланазы и модифицированные ксиланазы, как подчёркивается в данном описании, можно использовать для отбеливания бумажной пульпы или для других применений, обычно требующих активности фермента дикого типа при температурах и значениях pH, представленных выше. Для биоотбеливания пульпы предпочтительную ксиланазу получают из ксиланазы, классифицированной в 11-м Семействе (см. Таблицу 1).

Ксиланазы продуцируются многими видами грибов- гифомицетов и бактерий, на основании сходства структур и механизмов их можно разделить на два семейства, Семейство 10 и Семейство 11 (Henrissat, 1991). Ксиланазные ферменты Семейства 11 представляют собой группу малых ферментов с относительно низкой молекулярной массой (примерно, 20 кДа и около 200 аминокислотных остатков).

Ксиланазы Семейства 11, секретируемые *T. reesei*, являются негликозилированными, что согласуется с отсутствием консенсусного мотива N-гликозилирования в аминокислотной последовательности ксиланазы I (Tölgöpen et al., 1992). Однако, ксиланазы II также не являются гликозилированными, несмотря на присутствие двух консенсусных мотивов N-гликозилирования в её последовательности. Напротив, *T. reesei* целлюлазы являются N- гликозилированными по остаткам аспарагина внутри консенсусного мотива Asn-Xaa-Ser/Thr, где Xaa является любой аминокислотой, отличной от пролина (или N- X- S/T, где X обозначает любую аминокислоту, отличную от пролина). Однако, не все возможные сайты в различных целлюлазных ферментах являются гликозилированными (Hui et al., 2001 and 2002). Это наводит на мысль, что организм *Trichoderma* не распознаёт некоторые консенсусные мотивы в нативных аминокислотных последовательностях.

Настоящее изобретение включает модифицированную ксиланазу 11-го Семейства, содержащую последовательность или мотив гликозилирования, например, но без ограничения, Asn- Xaa- Ser/Thr, Asn- Xaa- Thr или Asn- Xaa- Ser, которая (который) в ином случае не присутствует в соответствующей ксиланазе, из которой получена модифицированная ксиланазы.

Кроме того, настоящее изобретение включает модифицированную ксиланазу 11-го Семейства, в которой одна или более чем одна аминокислота, выбранная из положений 34, 131, 180 и 182, замещена на аспарагин (Asp или N), причём положение определяют при выравнивании последовательности ксиланазы Семейства 11 с аминокислотной последовательностью ксиланазы II *Trichoderma reesei* по определению в SEQ ID NO: 1. Такая замена может быть описана как: X34N, X131N, X180N или X182N, где аминокислота "X" в указанном положении замещается на аспарагин, или "N". Например,

X131N указывает, что аминокислота "X" в положении 131 (определённом при выравнивании последовательности ксиланазы Семейства 11 с аминокислотной последовательностью ксиланазы II *Trichoderma reesei* (TrX II) по определению в SEQ ID NO: 1) заменено на аспарагин, или "N". Предпочтительно, мутация находится в положении 131, давая X131N, или в соответствующем ему положении в другой ксиланазе Семейства 11, как определено при выравнивании последовательности с TrX II (SEQ ID NO: 1). Согласно наблюдениям, модифицированная ксиланаза, содержащая одну или более чем одну такую мутацию, например замену X131N, проявляет повышенную эффективность экспрессии по сравнению с ксиланазой Семейства 11, из которой модифицированная ксиланаза получена или образована. Примеры конструкций, содержащих мутации X34N, X131N, X180N или X182N, включают ITX5 и ITX5', ITX1 и ITX2, ITX3 и ITX3', и ITX4 и ITX4', соответственно.

Дополнительные мутации, например, X34N-S36T, X180N-S182T и X182N-S184T, можно также ввести в ксиланазу 11-го Семейства для получения консенсусной последовательности Asp- Хаа- Thr, тем самым гарантируя, что Thr позиционирован в 3'- 5' направлении от Asp в ксиланазе. Примеры конструкций, содержащих мутации X34N,S36T; X180N,S182T; или X182N,S184T, включают ITX5', ITX3' и ITX4', соответственно.

Модифицированную ксиланазу по настоящему изобретению можно образовать из любой ксиланазы 11-го Семейства, например, ксиланазы, нативной для *Trichoderma*, включая, но без ограничения *T. reesei* ксиланазу II, *T. reesei* ксиланазу I, *Trichoderma viride* ксиланазу, или ксиланазу из *Aspergillus*, *Fusarium*, актиномицетов, таких как *Streptomyces*, например, но без ограничения, *Streptomyces lividans* ксиланазу B и *Streptomyces lividans* ксиланазу C, ксиланазу из *Bacillus*, *Thermobifida*, *Actinomadura*, *Chaetomium* или *Thermatoga*.

Для модификации *T. reesei* ксиланазы I (TrX I) введением мутации, эквивалентной мутации в положении 131, определённом на основании сравнения с последовательностью *T. ressei* ксиланазы II (TrX-II; SEQ ID NO:1), требуется мутация в положении 118 TrX-I (т.е. мутация T118N). В этом случае *T. ressei* ксиланаза I, с заменой в T118N, содержит мутацию, эквивалентную X131N, найденной в TrX II (см. Фигуру 1 для выравниваний "Tr1" и "Tr2"). Аналогично, модификация *S. lividans* ксиланазы C введением мутации, эквивалентной мутации в положении 131, определённом сравнением с последовательностью TrX-II, требует мутации в положении 128 *S. lividans* ксиланазы C (т.е. мутации T128N). В этом случае ксиланаза T128N в *S. lividans* ксиланазе C содержит мутацию, эквивалентную X131N в TrX-II (см. Фигуру 1 для выравниваний "SIC" и "Tr2").

Под термином "ксилаза" понимается фермент, который гидролизует ксилан до ксилозы. Ксиланазы могут обладать различными свойствами, включая структуру (молекулярная масса, трёхмерная ориентация, аминокислотный состав и активный сайт) и каталитическую активность (скорость и кинетика гидролиза ксилана и способность действовать на другие субстраты), что известно специалисту в данной области техники.

Модифицированную ксиланазу по настоящему изобретению можно образовывать из нативной, или дикого типа, ксиланазы, или её можно образовать из уже изменённой ксиланазы, которая уже является мутагенизированной и выбранной или полученной методами рекомбинантной ДНК с применением стандартных протоколов, которые должны быть известны специалисту в данной области техники, например, сайт-направленный мутагенез, химический мутагенез или эквивалентные методы, для изменения pH профиля, температурного профиля, специфичности к субстрату или их комбинации. Примеры таких изменённых ксиланаз включают ксиланазы по настоящему описанию, например, но без ограничения, HTX18 и HTX18- R135Y. Дополнительные примеры изменённых или созданных методами рекомбинантной ДНК ксиланаз, которые также можно модифицировать далее по данному описанию, включают ксиланазы, известные специалисту в данной области техники, например, но без ограничения, ксиланазы, раскрываемые в Международных заявках WO00/29587, WO01/92487 и WO03/046169, и включают, но без ограничения, 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- ANA- RR- DRHH; TrX- HML- ANAE- RR- DRHH; TrX- HML- ANAE- RRR- DRHH; TrX- 116G; TrX- 118C; TrX- HML- ANCAE- R; TrX- H- 11D- ML- ANGAE- RR; TrX- HML- ANGAE- R; TrX- H- 11D- ML- ANGCAE- RR; TrX- H- 11D- ML- ANCAE- RR.

Нативная ксиланаза или ксиланаза дикого типа представляет собой ксиланазу, в которой отсутствуют иные модификации или изменения помимо регулярных изменений в ходе естественного развития (в природе).

Под "выравниванием последовательности *Trichoderma reesei* ксиланазы II" или "TrX нумерацией" понимают нумерацию, связанную с положением аминокислоты, основанную на аминокислотной последовательности *Trichoderma reesei* ксиланазы II (также называемой TrX II; см. Таблицу 1, Tr2; Фигуру 1; и SEQ ID NO: 1). TrX II является членом 11-го Семейства ксиланаз. У ксиланаз 11-го Семейства наблюдается

значительная степень подобия последовательностей (см. Фигуру 1), поэтому, выравнивая аминокислоты для оптимизации подобия последовательностей ксиланазных ферментов и используя нумерацию аминокислот TrX II (*Trichoderma reesei* ксиланаза II) в качестве основы для нумерации, положения аминокислот в других ксиланазных ферментах можно определять относительно TrX II.

Структурные исследования показывают, что ксиланазы 11-го Семейства бактериального и грибкового происхождения имеют одинаковую основную молекулярную структуру (например, патент США 5405769), выявляя три типа вторичной структуры: бета-складки, повороты и единичную альфа-спираль. Ксиланазу можно классифицировать как "ксиланаза 11-го Семейства", если она содержит подобие другим ксиланазам 11-го Семейства, в частности, два остатка глутаминовой кислоты в положениях 86 и 177 (нумерация аминокислот в соответствии с нумерацией аминокислот в *Trichoderma reesei* ксиланазе II (TrX II)), которые могут служить в качестве каталитических остатков. Ксиланазы 11-го Семейства могут включать ксиланазы, перечисленные в Таблице 1. Предпочтительно, ксиланазы представляют собой *Trichoderma reesei* ксиланазу II, *Trichoderma reesei* ксиланазу I, *Trichoderma viride* ксиланазу, *Streptomyces lividans* ксиланазу B, *Streptomyces lividans* ксиланазу C или ксиланазу из *Aspergillus*, *Fusarium* или *Bacillus*.

Таблица 1. Типичные ксиланазные ферменты 11- го Семейства грибкового и бактериального происхождения

Микроорганизм	Ксиланаза	SEQ ID NO:	Swiss-Prot No
<i>Aspergillus niger</i>	Xyn A	SEQ ID NO:43	-
<i>Aspergillus awamori</i> var. <i>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>	XynA	SEQ ID NO:30	P09850
<i>Bacillus pumilus</i>	XynA	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>Clostridium acetobutylicum</i>	Xyn B	SEQ ID NO:33	-
<i>Clostridium 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	-	-
5	<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
10	<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	-
15	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Xyn A	SEQ ID NO:46	O43097
	<i>Trichoderma harzianum</i>	Xyn	SEQ ID NO:41	P48793
	<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn I	SEQ ID NO:2	P36218
20	<i>Trichoderma reesei</i>	Xyn II	SEQ ID NO:1	P36217
	<i>Trichoderma viride</i>	Xyn	SEQ ID NO:42	-

Модифицированная ксиланаза по настоящему изобретению представляет собой любую ксиланазу, которая создана (методом рекомбинантной ДНК) таким образом, чтобы ввести или содержать сайт гликозилирования, изменённый по сравнению с ксиланазой, из которой модифицированная ксиланаза получена или образована.

Неограничивающие примеры таких модификаций включают X34N, X34N-S36T, X131N, X180N, X180N-S182T, X182N или X182N-S184T (нумерация TrX), или их комбинацию. Предпочтительно, модифицированная ксиланаза является ксиланазой 11-го Семейства. Модифицированная ксиланаза по настоящему изобретению может содержать ферменты *Trichoderma reesei* ксиланазу I или II ферменты, или ферменты *Streptomyces lividans* ксиланазу B или C. Общеизвестно, что аминокислотную последовательность природной ксиланазы можно создать ("подогнать") таким образом, чтобы изменить её биохимические или биофизические свойства. Пример модифицированной ксиланазы по настоящему изобретению содержит мутацию X131N или её эквивалент, определённый сравнением выравнивания последовательности представляющей интерес ксиланазы с выравниванием последовательности TrX II (SEQ ID NO:1), и другие модификации, замены или делеции относительно соответствующей нативной ксиланазы. Некоторые примеры модифицированных ксиланаз, которые не следует рассматривать как ограничивающие, показаны в Таблице 2.

Замена в положении 131 на аспарагин, в сочетании с Thr/Ser в положении 133, которое является высококонсервативным в ксиланазах 11-го Семейства, приводит к созданию мотива N- гликозилирования: Asn- Хаа- Thr/Ser. Отмечалось, что в случае ксиланаз, содержащих мутацию 131N, наблюдается повышенное продуцирование ксиланазы. Не желая связывать себя теорией, отмечаем, что введение мотива N-гликозилирования может привести к повышенной эффективности экспрессии, пониженному распаду, повышенной секреции, или их комбинации, модифицированной ксиланазы по сравнению с нативным ксиланазным ферментом, не содержащим модификацию 131N. Модифицированная ксиланаза может проявлять повышенную экспрессию при использовании штамма- хозяина *Trichoderma* и может проявлять биохимические и биофизические свойства, сходные с биохимическими и биофизическими свойствами соответствующей нативной ксиланазы 11-го Семейства. Аналогичные мутации можно также получать в других сайтах, прилегающих к консервативному Thr/Ser в ксиланазе, например, но без ограничения, X34N, X180N и X182N (ITX 2, ITX 3 и ITX 4, соответственно; см. Таблицу 2), получая последовательность Asn- Хаа- Thr/Ser. В каждом из этих местоположений аминокислота Ser является консервативной, а 3-D моделирование скрученного белка показывает, что эти сайты позиционируются на внешней поверхности белка. Дополнительные модификации, которые можно сделать, включают X34N-S36T, X180N-S182T или X182N-S184T (ITX5', ITX3' и ITX4', соответственно), получая мотив гликозилирования Asn- Хаа- Thr.

Специалисты в данной области техники знают, что аминокислотные замены можно сделать различными способами, например, сайт- направленным или случайным мутагенезом, изменяя первичную пептидную последовательность ксиланазы для получения консенсусного мотива N-гликозилирования. Любой подходящий способ можно использовать для введения мутации X34N, X131N, X180N, X182N, X34N- S36T, X180N-S182T или X182N-S184T в ген Семейства ксиланаз. Например, мотивы N-гликозилирования скорее можно ввести прямой заменой одного или более кодонов в первичной ксиланазной последовательности, нежели добавлением дополнительных нуклеотидов, кодирующих мотив N-гликозилирования, с тем, чтобы повысить продуцирование ксиланазы при использовании хозяина, не изменяя биофизические и биохимические свойства фермента.

Под прямым (непосредственным) замещением понимают, что сайт гликозилирования вводится путём введения специфических нуклеотидных замен в область, кодирующую ксиланазу, которые изменяют первичную пептидную

последовательность, не изменяя её длины за счёт добавления или делеции одной или более аминокислот.

Как показано в Примере 11, и со ссылкой на Фигуры 5 и 6, ITX1 ксиланаза, содержащая мутацию T131N, а в ином случае имеющая мутации, подобные HTX18 (см. Таблица 2; в ITX1 отсутствует мутация Y135R), имеет рН и температурный профиль активности, аналогичный профилю HTX18 ксиланазы. Таким образом, добавление мутации T131N не изменяет биофизических и биохимических свойств ксиланазы. Кроме того, как показано в Таблицах 3 и 4 Примеров 9 и 10, соответственно, фермент ITX1 продуцируется с повышением эффективности экспрессии, примерно, 73% - 100% по сравнению с HTX18 или HTX18(R135Y).

Таблица 2: Примеры модифицированных ксиланаз

Ксиланаза	Описание
TrX-HML	TrX с N10H, Y27M и N29L (см. патент США 5759840)
HTX13	TrX с N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E
HTX18	TrX с N10H, Y27M, H29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R
ITX1	TrX с N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, T131N, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R
ITX 2	TrX с N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, T131N, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R
ITX 3	TrX с N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R и F180N
ITX 3'	TrX с N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R, F180N и S182T
ITX 4	TrX with N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R and S182N
ITX 4'	TrX с N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R, S182N и S184T
ITX 5	TrX с N10H, Y27M, N29L, Q34N, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R
ITX 5'	TrX с N10H, Y27M, N29L, Q34N, S36T, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R
HTX18- R135Y	TrX с N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R
Xln1(131N)	<i>T. reesei</i> ксиланаза I с мутацией T118N
<i>S. lividans</i> xlnC(131N)	<i>S. lividans</i> ксиланаза II с мутацией T128N

"Эффективность экспрессии" обозначает количество активного фермента, или ферментативную активность, продуцируемое хозяином- продуцентом. Эффективность экспрессии можно вычислить как количество активного фермента, или ферментативную активность, генерируемого на единицу объёма культуры для ферментации, если все

условия ферментации остаются постоянными. Первую ксиланазу считают имеющей повышенную экспрессию по сравнению со второй ксиланазой, если первая ксиланаза продуцируется с уровнями более высокими, чем вторая ксиланаза, тем же хозяином при тех же условиях ферментации. Например, если первая ксиланаза продуцируется в количестве, более высоком, чем, примерно, 40-2500%, или промежуточные значения между этими величинами, чем вторая ксиланаза, тем же хозяином и при тех же условиях ферментации, тогда эффективность экспрессии первой ксиланазы больше, чем эффективность экспрессии второй ксиланазы. Например, первая ксиланаза может продуцироваться в количестве, большем чем 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 или 2500%, или промежуточное значение, чем вторая ксиланаза, тем же хозяином в тех же условиях ферментации. Предпочтительно, первая ксиланаза продуцируется в количестве, по меньшей мере, на 50% больше, чем вторая ксиланаза, тем же хозяином в тех же условиях ферментации (см. Примеры 9 и 10).

Специалист в данной области техники понимает, что природную кодирующую область можно изменить или создать методом рекомбинантной ДНК с помощью замещения, замены, добавления или элиминирования одной или более нуклеиновых кислот, не изменяя её функции (т.е. ксиланазной активности). Осуществление на практике данного изобретения не ограничивается такими изменениями области, кодирующей ксиланазу.

Сигнал секреции

"Сигнал секреции" представляет собой пептидную последовательность, присутствующую в секретированном белке, обычно на аминоконце секретированного белка, который направляет вход белка в эндоплазматический ретикулум; сигнал секреции можно после этого отщеплять от зрелого секретированного белка с помощью сигнальной пептидазы.

Кодирующая область модифицированного гена ксиланазы по настоящему изобретению может быть функционально связана с последовательностью ДНК, кодирующей любой сигнал секреции (т.е. связана таким образом, что транскрибированная последовательность может быть направлена в ER), который является функциональным в заданном продуцирующем хозяине, например, но без ограничения, *Trichoderma*. Сигнал секреции ксиланазы может, быть например, сигналом секреции из любого секретированного белка *Trichoderma*, например, из *Trichoderma* ксиланазы, или из

другого белка грибкового или бактериального происхождения. Без ограничения, сигнал секреции может быть из гена *Trichoderma reesei* ксиланазы I (*xln1*) или гена ксиланазы II (*xln2*).

Специалист в данной области техники знает, что природный сигнал секреции можно модифицировать с помощью замещения, замены, добавления или элиминирования одной или более нуклеиновых кислот, не изменяя её функции в качестве сигнала секреции. Осуществление на практике данного изобретения не ограничивается такими изменениями сигнала секреции.

Промотор

Осуществление на практике данного изобретения не ограничивается выбором промотора в генетической конструкции. Предпочтительно, промотор является функциональным в хозяине для продуцирования. Промотор функционально связан с кодирующей областью модифицированного гена ксиланазы, или он функционально связан с сигналом секреции, который функционально связан с кодирующей областью модифицированного гена ксиланазы, так что промотор контролирует экспрессию кодирующей области, или сигнала секреции и кодирующей области. Ниоим образом не желая связывать себя, авторы отмечают, что предпочтительные промоторы, которые можно использовать в практическом применении настоящего изобретения, включают промоторы *Trichoderma cbh1*, *cbh2*, *eg1*, *eg2*, *eg3*, *xln1* и *xln2*, или комбинацию двух или более двух из этих промоторов.

Специалисты в данной области техники знают, что природный промотор можно модифицировать с помощью замещения, замены, добавления или элиминирования одной или более нуклеиновых кислот, не изменяя её функции в качестве промотора. Осуществление на практике данного изобретения не ограничивается такими изменениями промотора.

Дополнительные последовательности между сигналом секреции и кодирующей областью зрелой ксиланазы.

Генетическая конструкция ксиланазы может содержать дополнительные последовательности, которые кодируют дополнительные аминокислоты между сигналом секреции и кодирующей областью ксиланазы, или кодирующей области модифицированной ксиланазы по данному описанию. Эти последовательности, которые могут быть природными или синтетическими, могут кодировать одну или более аминокислот зрелого белка, соответствующих сигналу секреции, кодированному

конструкцией, или могут быть результатом прибавления сайтов рестрикции, необходимых для соединения последовательностей, кодирующих сигнал секреции, и области, кодирующей модифицированную ксиланазу. Осуществление на практике изобретения не ограничивается присутствием дополнительных ДНК последовательностей между областью, кодирующей сигнал секреции, и областью кодирования зрелой ксиланазы.

Другие элементы

Генетическая конструкция ксиланазы может содержать последовательность терминации транскрипции (транскрипционный терминатор), который является функциональной в хозяине- продуценте, как это известно специалисту в данной области техники. Сайт терминации транскрипции можно поместить непосредственно 5'- 3' (downstream) от области, кодирующей ксиланазу. Применение изобретения на практике не ограничивается выбором сайта терминации транскрипции, которого достаточно для того, чтобы направить терминацию транскрипции с помощью РНК полимеразы в продуценте- хозяине. Пример сайта терминации транскрипции, который никоим образом не следует рассматривать как ограничивающий, содержит 1.9 т.н.о. ДНК 3' к стоп- кодону гена *Trichoderma cbh2*, как описано в Примерах 5.1- 5.4.

Генетическая конструкция ксиланазы может содержать селективный маркер для определения трансформации продуцента-хозяина. Селективный маркер может присутствовать на том же самом плазмидном векторе, upstream или downstream от генетической конструкции (т.е. 5'или 3' от конца конструкции), или селективный маркер может котрансформироваться с помощью конструкции на отдельном плазмидном векторе.

Выбор селективных маркеров общеизвестен специалистам в данной области техники и включает гены (синтетические или природные), которые придают трансформированным клеткам способность использовать метаболит, который обычно не метаболизируется микроорганизмом (например, ген *A. nidulans amdS*, кодирующий ацетамидазу и придающий способность расти на ацетамиде как единственным источнике азота), или устойчивость к антибиотикам (например, ген *Escherichia coli hph*, кодирующий гигромицин- β - фосфотрансферазу и придающий устойчивость к гигромицину). Если в штамме-хозяине отсутствует функциональный ген выбранного маркера, тогда этот ген может быть использован в качестве маркера. Примеры таких маркеров включают *trp*, *pyr4*, *pyrG*, *argB*, *leu* и т.п. Следовательно, в соответствующем штамме-хозяине должен отсутствовать функциональный ген, соответствующий

выбранному маркеру, т.е. дефицитный по экспрессии *trp*, *pyr*, *arg*, *leu* и т.п. Не ограничивающий пример селективного маркера, применяемого в генетических конструкциях, описан в Примере 5.1. В этом примере селективным маркером является ген *E. coli hph*, экспрессированный с применением промотора *Trichoderma* фосфоглицераткиназы (*pgk*). Альтернативный селективный маркер описан в Примере 5.2 и содержит ген *Neurospora crassa pyr4*, экспрессированный с применением его нативного промотора.

Настоящее изобретение включает генетические конструкции и генетически модифицированные продуценты-хозяева, например, штаммы *Trichoderma*, экспрессирующие модифицированные ксиланазы, которые вводят или изменяют сайт гликозилирования в ксиланазе. Неограничивающие примеры модифицированных ксиланаз, содержащих введённый сайт гликозилирования, включают одну или более одной мутации X34N, X131N, X180N, X182N, X34N-S36T, X180N-S182T или X182N-S184T (нумерация TrX II).

Генетическая конструкция модифицированной ксиланазы по настоящему изобретению не ограничивается способом получения конструкции, который может включать, но без ограничения, стандартные методы молекулярной биологии, такие как выделение плазмидной ДНК из *E. coli* методом щелочного лизиса, расщепление плазмидной ДНК рестриктазами, разделение и выделение фрагментов ДНК электрофорезом на агарозном геле, лигирование фрагментов ДНК с Т4 ДНК лигазой, инсерция уникальных сайтов рестрикции по концам фрагментов ДНК полимеразной цепной реакцией или добавлением олигонуклеотидных линкеров, и дефосфорилирование фрагментов ДНК с помощью Т4 ДНК полимеразы или ДНК-полимеразы Клёнова, ДНК-полимеразы I *E. coli*. Такой метод описан в Примерах 1-5.

В другом аспекте настоящего изобретения генетическая конструкция модифицированной ксиланазы вводится в заданного (продуцент) хозяина хозяина микробного происхождения. Предпочтительно, эффективность экспрессии модифицированных ксиланаз в полученном микроорганизме повышается. Например, эффективность экспрессии может быть, по меньшей мере, на 40% или более выше эффективности экспрессии соответствующей ксиланазы 11-го Семейства, продуцированной при использовании соответствующей генетической конструкции, из которой модифицированная ксиланаз образована или получена, в том же самом хозяине хозяина микробного происхождения в тех же условиях ферментации. Например, первая ксиланаз может продуцироваться в количестве, большем чем 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 или 2500%, или любое промежуточное значение, чем вторая ксиланаза, тем же хозяином в тех же условиях ферментации. Предпочтительно, первая ксиланаза продуцируется в количестве, по меньшей мере, на 50% больше, чем вторая ксиланаза, тем же хозяином в тех же условиях ферментации (см. Примеры 9 и 10).

Осуществление на практике настоящего аспекта изобретения не ограничивается способом введения генетической конструкции ксиланазы в хозяина микробного происхождения (продуцент-хозяин). Методы введения конструкции ДНК в продуцента-хозяина известны специалистам в данной области техники и включают, но без ограничения, обработку хлоридом кальция бактериальных клеток или протопластов грибов для ослабления клеточных мембран, добавление полиэтиленгликоля для содействия слиянию клеточных мембран, деполяризацию клеточных мембран электропорацией или "стрельба" ДНК через клеточную стенку и мембраны с помощью бомбардировки микрочастицами из ружья, заряженного частицами ("корпускулярное ружье").

Продуцент-хозяин может быть представителем вида *Trichoderma* (который в разное время классифицировали как *T. viride*, *T. longibrachiatum* и, совсем недавно, как *Hypocrea jecorina*- Simmons, 1977; Bissett, 1984; Cannon 1986; Kuhls et al., 1996). Эти виды очень подходят, так как они продуцируют ксиланазы 11-го Семейства. Кроме того, были опубликованы методы введения конструкций ДНК в продуцирующие целлюлазу штаммы *Trichoderma* (Lorito et al., 1993; Goldman et al., 1990; Penttila et al., 1987).

В Примере 7.1 описывается один метод введения генетической конструкции ксиланазы в споры *Trichoderma* с помощью "корпускулярного ружья". В Примере 7.2 описывается метод введения генетической конструкции ксиланазы в протопласты *Trichoderma*, обработанные полиэтиленгликолем и хлоридом кальция.

Повышение эффективности экспрессии, например, повышение эффективности экспрессии на 50% по сравнению с нативной ксиланазой 11-го Семейства, является заметным повышением, которое намного выше естественной изменчивости штамма и промышленно значимо. Результаты показывают, что степень повышения продуцирования ксиланазы с помощью этого метода может быть 2^x -кратной и может достигать более 10-кратной величины. Измерение степени повышения продуцирования ксиланазы проводят с помощью выращивания в культуре и измерения ксиланазной активности, как описано в Примере 8.

Специалисты в данной области техники понимают, что специфическую ксиланазную активность смеси ферментов (в М.Ед/мг белка) можно повысить, понижая количество целлюлазы и других белков в смеси ферментов. При желании это можно
 5 осуществлять физическим и механическим разделением смеси ферментов, удаляя целлюлазу и другие белки из смеси, или делецией гена целлюлазы или других генов методами рекомбинантной ДНК из продуцирующего хозяина, так что экспрессия
 10 целлюлазы или других белков снижается или исключается. Такие методы либо оказывают небольшое влияния, либо не оказывают никакого влияния на действительное продуцирование ксиланазы продуцентом- хозяином.

Ксиланазы и модифицированные ксиланазы, как подчёркивается в данном описании, можно использовать для отбеливания пульпы или для других целей, где требуется активность фермента дикого типа при указанных выше значениях температур и рН. Для биоотбеливания пульпы наиболее часто применяется ксиланаза, образованная из
 20 ксиланазы, относящейся к 11-му Семейству (см. Таблицу 1). Модификации, приведённые в данном описании, можно обнаружить в нативных ксиланазных белках, и эти нативные ксиланазные ферменты, при экспрессии в иных (не-нативных) продуцентах- хозяевах,
 25 могут проявлять нужные признаки по данному описанию и включены в объем настоящего изобретения.

Осуществление на практике настоящего изобретения не ограничивается
 30 промышленным применением модифицированной ксиланазы. Промышленное применение ксиланазы, продуцированной по данному изобретению, включает, но без ограничения, пищевую промышленность, например, кормовые добавки для птиц и свиней, хлебопекарную или пивоваренную промышленность или такие промышленные
 35 процессы, как производство пульпы и бумаги.

Ниже кратко перечислены последовательности, раскрываемые в настоящем изобретении (SEQ ID NO: 28- 45 относятся к ксиланазам, полученным при использовании
 40 перечисленных организмов (более подробно см. Таблицу 2):

Последовательность	Название	Последовательность	Название
45 SEQ ID NO:1	TrxII (Tr2)	SEQ ID NO:25	S182,S184T
SEQ ID NO:2	TrxI (Tr1)	SEQ ID NO:26	Q34N
SEQ ID NO:3	S75A	SEQ ID NO:27	Q34N,S36T
50 SEQ ID NO:4	L105H	SEQ ID NO:28	<i>Aspergillus awamori</i> <i>var.kawachi</i>
SEQ ID NO:5	S125A	SEQ ID NO:29	<i>Aspergillus tubigensis</i>

5	SEQ ID NO:6	I129E	SEQ ID NO:30	<i>Bacillus circulans</i>
	SEQ ID NO:7	Y135R	SEQ ID NO:31	<i>Bacillus pumilus</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 stercorarium</i>
10	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>
15	SEQ ID NO:13	T13N,R135Y	SEQ ID NO:37	<i>Streptomyces sp. No. 36a</i>
	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
20	SEQ ID NO:16	XynC- 5F (Nhe)	SEQ ID NO:40	<i>Thermomonospora fusca</i>
	SEQ ID NO:17	XynC- 3R (Kpn)	SEQ ID NO:41	<i>Trichoderma harzianum</i>
	SEQ ID NO:18	T118N	SEQ ID NO:42	<i>Trichoderma viride</i>
25	SEQ ID NO:19	XynI- F	SEQ ID NO:43	<i>Aspergillus niger</i>
	SEQ ID NO:20	XynI- 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>
30	SEQ ID NO:22	F180N	SEQ ID NO:46	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
	SEQ ID NO:23	F180N,S182T	SEQ ID NO:47	модифицированная <i>T. reesei</i> ксиланаза I (T131N)
35	SEQ ID NO:24	S182N	SEQ ID NO:47	модифицированная <i>S. lividans</i> ксиланаза C (T131N)

Далее настоящее изобретение иллюстрируется нижеприведёнными примерами.

Примеры

В Примере 1 описано выделение геномной ДНК из штамма *Trichoderma reesei* M2C38 и генетически модифицированных производных этих штаммов. В Примерах 2- 5 описывается конструирование библиотек геномной ДНК, клонирование различных генов, модификация последовательностей гены ксиланазы и несколько генетических конструкций для экспрессии модифицированных ксиланаз из штаммов *Trichoderma reesei* RutC30 и M2C38. В примерах 7-10 описывается трансформация и экспрессия генетических конструкций ксиланазы в штаммах *Trichoderma reesei* RutC30 и M2C38. В

Примерах 11 и 12 описываются биохимические характеристики модифицированной и нативной ксиланаз.

5

Пример 1: Выделение геномной ДНК *Trichoderma reesei* и создание геномных библиотек *T. reesei*

10

Штамм *Trichoderma reesei* M2C38 представляет собой штамм, запатентованный Iogen Corporation, образованный из *Trichoderma reesei* RutC30 (ATCC #56765; Montenecourt and Eveleigh, 1979), который, в свою очередь, образован из *Trichoderma reesei* Qm6A (ATCC #13631; Mandels and Reese, 1957). Специалисты в данной области техники хорошо понимают, что представленные в данном описании методики, генетические конструкции, полученные при использовании этих штаммов, и экспрессия генетических конструкций в этих штаммах применимы для всех штаммов *Trichoderma*, образованных из Qm6A.

15

20

25

30

35

40

45

50

Для выделения геномной ДНК 50 мл картофельной- декстрозного бульона (Difco) инкубируют со спорами *T. reesei*, собранными с плашки с картофельно- декстрозным агаром стерильной инокуляционной петлёй. Культуры встряхивают при 200 об/мин в течение 2-3 дней при 28°C. Мицелий отфильтровывают на стеклянном микроволокнистом фильтре GFA (Whatman) и отмывают холодной, деионизированной водой. Осадки на фильтре грибкового происхождения замораживают в жидком азоте, измельчают в порошок в предварительно охлаждённой ступке предварительно охлаждённым пестиком; 0.5 г порошковой биомассы ресуспендируют в 5 мл 100 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 7.5 плюс 1% додецилсульфата натрия (SDS). Лизат центрифугируют (5000g в течение 20 мин, 4°C) для осаждения клеточного дебриса. Супернатант экстрагируют 1 объёмом буфера (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0), насыщенного фенолом, с последующей экстракцией 1 объёмом смеси насыщенный фенолом буфер: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1) для удаления растворимых белков. ДНК осаждают из раствора, добавляя 0.1 объёма 3 M ацетата натрия, pH 5.2 и 2.5 объёма холодного 95% этанола. После инкубации в течение, по меньшей мере, 1 часа при -20°C, ДНК осаждают центрифугированием (5000g в течение 20 мин, 4°C), отмывают 10 мл 70% этанола, сушат на воздухе и ресуспендируют в 1 мл 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0. РНК расщепляют, добавляя рибонуклеазу А (Boehringer Mannheim) до конечной концентрации 0.1 мг/мл с последующей инкубацией при 37°C в течение 1 часа. Последующие экстракции 1 объёмом буфера, насыщенного фенолом, и 1 объёмом смеси насыщенный фенолом буфер: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1) используют для удаления рибонуклеазы из раствора ДНК. ДНК снова осаждают, добавляя 0.1 объёма 3M ацетата натрия, pH 5.2 и

2.5 объёмы холодного 95% этанола, осаждают центрифугированием отмывают 70% этанолом, сушат на воздухе и ресуспендируют в 50 мкл 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH8.0. Концентрацию ДНК определяют, измеряя оптическую плотность раствора при 260 нм (р. C1 в Sambrook et al., 1989).

Две плазмидные библиотеки и одну фаговую библиотеку создают с применением ДНК, выделенной из штамма *T. reesei* M2C38. Плазмидные библиотеки создают в векторе pUC119 (Viera and Messing, 1987) следующим образом: 10 мкг геномной ДНК гидролизуют (расщепляют) в течение 20 час при 37°C в объёме 100 мкл с помощью 2 единиц/мкг рестриктаз *HindIII*, *BamHI* или *EcoRI*. Гидролизованную ДНК фракционируют на 0.75% агарозном геле в 0.04M Tris-ацетата, 1 mM EDTA и окрашивают этидия бромидом. Срезы геля, соответствующие размерам интересующих генов (на основании опубликованной информации и Саузерн блотов) вырезают и подвергают электроэлюции для регенерации фрагментов ДНК (Sambrook et al., pp. 6.28- 6.29). Эти обогащённые фракции ДНК лигируют в pUC119, чтобы создать генные лаборатории в реакциях лигирования, в которые вводят 20-50 мкг/мл ДНК при молярном отношении вектор: инсерт ДНК 2:1, 1 mM АТР и 5 единиц Т4 ДНК лигазы в общем объёме 10-15 мкл при 4°C в течение 16 час. Штамм *Escherichia coli* HB101 подвергают электропорации в реакционных смесях для лигирования, используя систему Cell Porator System (Gibco/BRL) в соответствии с протоколом производителя, и трансформанты, отобранные на LB агаре, содержащем 70 мкг/мл ампициллина.

Фаговую библиотеку создают в лямбда векторе λXDASH (Stratagene, Inc.) следующим образом: геномная ДНК (3 мкг) расщепляют с помощью 2, 1, 0.5 и 0.5 единиц/мкг *Bam HI* в течение 1 часа при 37°C, получая 9-23 т.н.о. ДНК из каждого расщепления очищают экстракцией 1 объёмом смеси Tris-замещённый фенол: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1) с последующим осаждением с помощью 10 мкл 3M ацетата натрия, pH 5.2 и 250 мкл 95% этанола (-20°C). Гидролизованную ДНК осаждают микроцентрифугированием, отмывают 0.5 мл холодного 70% этанола, сушат на воздухе и ресуспендируют в 10 мкл стерильной деионизированной воды. Обогащение фрагментов размером 9- 23 т.н.о. подтверждают электрофорезом на агарозном геле (0.8% агарозы в 0.04 M Tris- ацетат, 1 mM EDTA). Расщеплённую ДНК (0.4 мкг) лигируют с 1 мкг λDASH плеч, предварительно отщеплённых с помощью *BamHI* (Stratagene), в реакционной смеси, содержащей 2 единицы Т4 ДНК лигазы и 1 mM АТР в общем объёме 5 мкл при 4°C в течение ночи. Смесь для лигирования упаковывают в фаговые частицы, используя экстракты для упаковки GigaPack® II Gold (Stratagene), согласно протоколу

производителя. Библиотеку титруют, используя штамм-хозяин *E. coli* XL1-Blue MRA (P2), и найдено, что она содержит 3×10^5 независимых клонов.

Пример 2: Выделение геномных клонов из библиотек *T. reesei* M2C38

2.1 Клонирование генов целлюбогидролазы I (*cbh1*) и целлюбогидролазы II (*cbh2*) из библиотек pUC119

E. coli HB101 трансформанты, содержащие клоны *cbh1* или *cbh2* из рекомбинантных pUC119- *Bam*HI или *Eco*RI библиотек, идентифицируют (lift-) гибридизацией методом снятия колонии: $1-3 \times 10^4$ колоний переносят на нейлоновые мембраны HyBond™ (Amersham); мембраны помещают колониями сверху на бумагу для блоттинга (VWR 238), насыщенную в течение 5 мин 0.5 М NaOH, 1 М NaCl для лизиса бактериальных клеток и денатурации ДНК; затем мембраны нейтрализуют, помещая колониями сверху на бумагу для блоттинга (VWR 238), насыщенную в течение 5 мин 1.5 М Tris, pH 7.5, плюс 1 М NaCl; мембрану оставляют сушиться на воздухе в течение 30 мин, и затем фиксируют ДНК на мембранах, нагревая при 80°C в течение 2 час.

³²P- меченные зонды готовят ПЦР амплификацией коротких (0.7- 1.5 т.н.о.) фрагментов *cbh1* и *cbh2* кодирующих областей обогащённого пула *Bam*HI или *Eco*RI фрагментов, соответственно, в реакционной смеси для мечения, содержащей 10-50 нг целевой ДНК, 0.2 мМ каждой d(GCT)TP, 0.5 мкМ dATP, 20-40 мкКи α-³²P-dATP, 10 пмоль олигонуклеотидных праймеров и 0.5 единиц полимеразы Taq в общем объёме 20 мкл. Реакционную смесь подвергают 6- 7 циклам амплификации (95°C, 2 мин; 56°C, 1.5 мин; 70°C, 5 мин). Амплифицированную, ³²P- меченную ДНК осаждают, добавляя 0.5 мл 10% (вес/объём) трихлоруксусной кислоты и 0.5 мг тРНК. ДНК осаждают микроцентрифугированием, дважды отмывают 1 мл 70% этанола, сушат на воздухе и ресуспендируют в 1М Tris pH7.5, 1 мМ EDTA.

Нейлоновые мембраны, на которых фиксируют рекомбинантные pUC119 плазмиды, предварительно гибридизуют в запаянных пакетах в течение 1 часа при 60-65°C в 1 М NaCl, 1% SDS, 50 мМ Tris, 1 мМ EDTA pH 7.5 со 100 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося. Гибридизацию проводят в запаянных пакетах в том же буфере, только содержащем 50 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося и с 5×10^6 - 5×10^7 cpm денатурированного *bg11*, *cbh1* или *cbh2* зонда в течение 16-20 час при 60- 65°C. Мембраны отмывают в течение 15 мин раствором 1 М NaCl, 0.5% SDS при 60°C, дважды по 15 мин раствором 0.3М NaCl, 0.5% SDS при 60°C и один раз в течение 15 мин раствором 0.03М NaCl, 0.5% SDS at 55°C. Мембраны снова помещают в запаянные пакеты и экспонируют с рентгеновской плёнкой

Kodak RP в течение 16-48 час при -70°C. Рентгеновскую плёнку проявляют в соответствии с протоколом производителя. Выбирают колонии, дающие сильный или слабый сигнал, и культивируют в средах 2xYT, дополненных 70 мкг/мл ампициллина. Плазмидную ДНК выделяют из этих культур методом щелочного лизиса (Sambrook, et al., стр. 1.25- 1.28) и анализируют рестрикционным расщеплением, Саузерн- гибридизацией (Sambrook, et al., стр. 9.38- 9.44) и ПЦР анализом (Sambrook, et al., стр. 14.18- 14,19).

Клоны, несущие ген *cbh1*, идентифицируют lift- гибридизацией методом снятия колонии pUC119-*BamHI* библиотеки с зондом 0.7 т.н.о. *cbh1*, полученным с помощью олигонуклеотидных праймеров, созданным для амплификации п.о. 597-1361 опубликованной последовательности *cbh1* (Shoemaker et al., 1983). Выделяют клон *cbh1*, pCOR132, содержащий фрагмент 5.7 т.н.о. *BamHI*, соответствующий промотору (4.7 т.н.о.) и 1 т.н.о. *cbh1* структурного гена (2.3 т.н.о.). Из него фрагмент *EcoRI*, 2.5 т.н.о., содержащий промотор *cbh1* (2.1 т.н.о.) и 5'конец кодирующей области *cbh1* (0.4 т.н.о.), субклонировуют в pUC119, получая pCB152. Клоны, несущие ген *cbh2*, идентифицируют (lift-) гибридизацией методом снятия колонии из библиотеки pUC119- *EcoRI* с зондом 1.5 т.н.о. *cbh2*, полученным с применением олигонуклеотидных праймеров, созданных для амплификации н.о. 580-2114 опубликованной последовательности *cbh2* (Chen et al. 1987). Выделяют клон *cbh2*, pZUK600, содержащий *EcoRI* 4.8 т.н.о. фрагмент соответствующий промотору (600 н.о.), структурному гену (2.3 т.н.о.) и терминатору (области терминации транскрипции) (1.9 т.н.о.).

2.1 Клонирование сайта терминации транскрипции *cbh1*, гена ксиланазы II (*xln2*) и промотора фосфоглицераткиназы (*pgk p*). при использовании λ DASH библиотек

Зонды, меченные дигоксиген- 11- dUTP, получают из ПЦР- амплифицированных кодирующих областей генов *cbh1*, *xln2* и *pgk* мечением со случайными праймерами, используя набор для мечения и обнаружения DIG Labelling and Detection kit (Boehringer Mannheim) и следуя протоколам производителя. Геномные клоны, содержащие гены *cbh1*, *xln2* и *pgk*, идентифицируют гибридизацией методом снятия фаговых бляшек (plaque- lift) из библиотеки λ DASH. Для каждого представляющего интерес гена 1×10^4 клонов переносят на найлоновые мембраны Nytran® (Schleicher and Schull). Фаговые частицы лизируют и фаговую ДНК денатурируют, помещая мембраны бляшками вверх на бумагу для блоттинга (VWR238), насыщенную 0.5 М NaOH, 1 М NaCl в течение 5 мин; затем мембраны нейтрализуют, помещая бляшками сверху на бумагу для блоттинга, насыщенную в течение 5 мин 1.5 М Tris, pH 7.5, плюс 1 М NaCl за 5 мин; мембрану оставляют сушиться на воздухе в течение 30 мин, и затем фиксируют ДНК на мембранах,

нагревая при 80°C в течение 2 час. Мембраны затем подвергают прегибридизации в запаянных пакетах в растворе состава: 6X SSPE, 5X раствора Денхардта, 1% SDS плюс 100 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося при 65°C в течение 2 час. Затем мембраны гибридизуют в запаянных пакетах в том же растворе, содержащем 50 мкг/мл денатурированной фрагментированной ДНК спермы лосося и 0.5 мкг зондов, меченных дигоксиген- dUTP при 65°C в течение ночи. Мембраны отмывают дважды по 15 мин в растворе 2X SSPE, 0.1% SDS при RT, дважды по 15 мин в растворе 0.2X SSPE, 0.1% SDS при 65°C и один раз в течение 5 мин в 2X SSPE. Позитивно гибридизующиеся клоны идентифицируют реакцией с конъюгатом антитела против дигоксигенина/щелочная фосфатаза, 5- бром- 4- хлор- 3- индолилфосфатом и 4- нитро-голубым тетразолия хлоридом (Boehringer Mannheim) согласно протоколу производителя. Позитивно гибридизующиеся клоны очищают далее с помощью второго раунда скрининга с зондами, меченными дигоксиген-dUTP.

Индивидуальные клоны выделяют и фаговую ДНК очищают как описано в Sambrook et al. (1989) стр. 2.118- 2.121, за исключением того, что стадию с градиентом CsCl заменяют экстракцией 1 объёмом смеси фенол: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1) и 1 объёмом смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1). ДНК осаждают 0.1 объёма 3М ацетата натрия, pH 5.2 и 2.5 объёмами холодного 95% этанола. Осаждённую фаговую ДНК отмывают с помощью 0.5 мл холодного 70% этанола и ресуспендируют в 50 мкл 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH8.0. Рестрикционные фрагменты, содержащие представляющие интерес гены, идентифицируют рестрикционным расщеплением очищенной фаговой ДНК и Саузерн- блот гибридизацией (Sambrook, et al., стр. 9.38- 9.44), используя те же самые зонды, меченные дигоксиген- dUTP, что и зонды, применяемые для скрининга библиотеки λ DASH. Мембраны гибридизуют и позитивно гибридизующиеся фрагменты визуализуют теми же методами, что и методы, применяемые для (lift) гибридизации методом снятия фаговых бляшек. Когда заданные фрагменты рестрикции из каждого клона λ DASH идентифицируют, рестрикционное расщепление повторяют, фрагменты разрешают на 0.8% агарозном геле на TAE и заданные полосы вырезают. ДНК элюируют со срезов геля, используя набор Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia) согласно протоколу производителя.

Клоны, несущие ген *cbh1*, идентифицируют (лифт) гибридизацией методом снятия колонии библиотеки λ DASH (Пример 2) с зондом *cbh1*, содержащим п.о. 45- 2220 опубликованной последовательности *cbh1* (Shoemaker et al.). Фрагмент *BamHI*, 1.8 т.н.о., содержащий 3' конец кодирующей области *cbh1*, (0.5 т.н.о.) и область терминации *cbh1* (1.3 т.н.о.) выделяет расщеплением фаговой ДНК, очищенной от клона λ DASH *cbh1*.

Этот фрагмент субклонируют в сайт *Bam*HI плазмидного вектора *E.coli* pUC119, получая плазмиду pCB1Ta.

Клоны, несущие ген *xln2* gene, идентифицируют с помощью гибридизацией методом снятия колонии (lift) из библиотеки λ DASH library (Пример 2) с зондом *xln2*, содержащим п.о. 100- 783 из опубликованной последовательности *xln2* (Saarelainen et al., 1993). Фрагмент 5.7 т.н.о. *Kpn*I, содержащий промотор (2.3 т.п.о.), кодирующую область (0.8 т.н.о.) и область терминации (2,6 т.н.о) гена *xln2*, выделяют рестрикционным расщеплением фаговой ДНК, очищенной от λ DASH *xln2* клона. Этот фрагмент субклонируют в *Kpn*I сайт pUC119, получают плазмиду pXYN2K- 2. Клоны, несущие ген *pgk*, идентифицируют (lift) гибридизацией методом снятия колонии из библиотеки λ DASH (Пример 2) с зондом *pgk1*, содержащим п.о. 4-1586 опубликованной последовательности *pgk* (Vanhanen et al., 1989). Фрагмент 5.0 т.н.о. *Eco*RI, содержащий промотор (2.9 т.н.о.), кодирующую область (1.6 т.н.о.) и область терминации (0.5 т.н.о.) *pgk* гена выделяют рестрикционным расщеплением фаговой ДНК, очищенной от λ DASH *pgk* клона. Этот фрагмент субклонируют в сайт *Eco*RI pUC119, получая плазмидную pGK5.0.

Пример 3: Клонирование и модификация генов *T. reesei* ксиланазы I и *S. lividans* ксиланазы C

Ксиланазу C (*xylC*; SEQ ID NO:39) амплифицируют с помощью геномной ДНК, выделенной из *Streptomyces lividans* (Strain IAF911-A.8, Kebir et al. Biochimica et Biophysica Acta 1491 (2000) 177-184), используя праймеры, которые вводят сайт *Nhe*I 5' (апстрим) и сайт *Kpn*I 3' (даунстрим) от кодирующей последовательности. ПЦР мегапраймер используют для введения мутации T128N в *xylC*. Мутагенный праймер используют в сочетании с обратным праймером для введения сайта *Kpn*I 3' (даунстрим). Полученный ПЦР продукт выделяют и используют в качестве обратного праймера в сочетании с прямым праймером для введения сайта *Nhe*I 5' (апстрим). Последовательность модифицированной *S. lividans* ксиланазы C показана в SEQ ID NO: 48). Последовательности праймеров приводятся ниже:

T128N: CCCTCCGTGG AAGGCAACAA GACCTTCCAG (SEQ ID NO: 15)

XynC- 5F(Nhe): GCCCACGCCG CTAGCACCAT CACC (SEQ ID NO: 16)

XynC- 3R(Kpn): CGTCCACCGG TACCAGGTCA ACC (SEQ ID NO: 17)

Ген, кодирующий ксиланазу I (*xylI*; SEQ ID NO:2), амплифицируют с применением геномной ДНК, выделенной из штамма *T. reesei* M2C38, используя праймеры, которые вводят сайт *Nhe*I апстрим и сайт *Bam*HI даунстрим от кодирующей

последовательности. ПЦР мегапраймер используют для введения мутации T128N в *xyIC*. Мутагенный праймер используют в сочетании с обратным праймером для введения сайта *Bam*HI 3' (даунстрим). Полученный ПЦР продукт выделяют и используют в качестве
 5 обратного праймера в сочетании с прямым праймером для введения сайта *Nhe*I 5' (апстрим). Последовательность модифицированной *T. reesei* ксиланазы C показана в SEQ ID NO: 47). Последовательности праймеров приводятся ниже:

10 T118N: CCATCCAGGG CAACGCGACC TTC (SEQ ID NO: 18)
 XynI- F: CGTCGTGCTA GCATCAACTA CGAC (SEQ ID NO: 19)
 XynI- R (*Bam*HI): GGATCCTAGT TGCTGACAC (SEQ ID NO: 20)

15 Аминокислотные последовательности нативной, немодифицированной *T. reesei* ксиланазы I и *S. lividans* ксиланазы C, кодированные генетическими конструкциями, описанными в Примерах 5.4 и 5.5, представлены как SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 39,
 20 соответственно.

25 Пример 4: Мутагенез *T. reesei* ксиланазы II с образованием вариантов HTX18, ITX1-5, HTX3'- 5', HTX18(R135Y)

4.1 Введение мутаций N10H, Y27M, N29L:

30 Получение методом рекомбинантной ДНК гена *xln2* при использовании штамма M2C38 осуществляют касетным мутагенезом синтетического *xln2* гена (Sung et al., 1995; также см. Международные заявки WO 01/92487 и WO 03/046169; которые вводятся в данное описание в качестве ссылки). Конкретно, двухцепочечный фрагмент *Apa*I/*Pin*AI,
 35 содержащий кодоны 8- 33, где кодоны 10, 27 и 29 изменены, как указано в SEQ ID: 2, синтезируют *in vitro*. Этот фрагмент затем используют для замены нативной *xln2* последовательности в плазмиде pUC/Xln (Sung et al., 1993). Синтетическую ДНК,
 40 содержащую кодоны 32-190 в pUC/XLN, замещают соответствующим геномным фрагментом *T. reesei xln2*, содержащим интрон 108 п.о. в кодоне 58, который амплифицирован с применением геномной *T. reesei* ДНК в качестве матрицы и введением
 45 уникального сайта *Pin*AI в кодонах 31 и 32 и уникального сайта *Bam*HI непосредственно даунстрим (3') от TAG стоп- кодона. В результате получают pUC/HTX4.

4.2 Введение мутаций 75A, 105H, 125A, 129E:

50 Фрагмент *Sst*I 3.2 т.н.о., содержащий промоторные области, *xln2* ген и части области терминации *cbh2*, выделяют из pC/XHML-TV (Пример 5.1, см. ниже) и

клонировать в сайт *Sst*I в полилинкере вектора мутагенеза, р ALTER®- 1 (Promega). Для изменения специфических аминокислот проводят четыре последовательных раунда мутагенеза, используя праймеры, специально созданные для включения заданных мутаций:

S75A: AGCTACCTCG CCGTGTACGG (SEQ ID NO:3),

L105H: CCACCAAGCA CGGCGAGGT (SEQ ID NO:4),

S125A: ACGCAGCGCG TCAACGCCCC GTCCATCATC GGC (SEQ ID NO:5),

и

I129E: AACGCCCCGT CCATCGAGGG CACCGCCACC TTT (SEQ ID NO:6)

(см. соответствующие методы в Международных заявках WO01/92487 и WO03/046169); при этом получают плазмиду рALT-HTX13 (плазмида показана в её родовой форме, "рALT- H(I)TXn", на Фигуре 3). Включение всех мутаций проверяют анализом ДНК последовательности.

4.3 Введение мутаций Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162 и T165H

Четыре последовательных раунда мутагенеза плазмиды рALT-HTX13 осуществляют, применяя *in vitro* Mutagenesis System (систему для мутагенеза) Promega Altered Sites® II для введения шести нацеленных аминокислотных замен и получения рALT- HTX18, следующим образом:

-добавляют мутации 135R и 144R к рALT-HTX13 при использовании последовательностей праймеров:

Y135R: GGCACCGCCA CCTTCGCCA GTACTGGTCC (SEQ ID NO: 7) В

H144R: GTCCGCCGCA ACCGCCGCTC GAGCGCCTC (SEQ ID NO:8)

получают рALT- HTX13+135R/144R;

-добавляют мутации 157D и 162H к рALT- HTX13+ 135R/144R при использовании последовательностей праймеров:

N157D: AACCACTTCG ACGCGTGG (SEQ ID NO: 9) и

Q162H: GGCTCAGCAC GGCCTGACG (SEQ ID NO:11),

получают рALT- HTX13+135R/144R/157D/162H;

-добавляют мутации 161R к рALT- HTX13+135R/144R/157D/162H при использовании последовательности праймера:

Q161R: TTCGACGCGT GGGCTCGCCA CGGCCTGACG CTC (SEQ ID NO: 10),

получают рALT- HTX13+135R/144R/157D/161R/162H;

-добавляют мутацию 165H к рALT- HTX13+135R144R157D/161R/162H при использовании последовательности праймера:

T165H: GCTCGCCACG GCCTGCACCT CGGGACGATG GAT (SEQ ID NO: 12),
получают рALT- HTX18. Плазмида показана в её родовой форме, "рALT- H(I)TXn", на Фигуре 3. Включение всех мутаций проверяют анализом ДНК последовательности.

4.4 Реверсия мутации Y135R и введение T131N в HTX18

Один раунд мутагенеза плазмиды рALT- HTX18 осуществляют, применяя *in vitro* Mutagenesis System (систему для мутагенеза) Promega Altered Sites ® II и последовательность праймера:

T131N, R135Y: GGCAACGCCA CCTTTTACCA GTACTGGTCC (SEQ ID NO: 13)
для введения мутаций T131N и R135Y и получения рALT- ITX1. Плазмида показана в её родовой форме, "рALT- H(I)TXn", на Фигуре 3. Включение всех мутаций проверяют анализом ДНК последовательности.

4.5 Реверсия мутации Y135R в HTX18

Один раунд мутагенеза плазмиды рALT- HTX18 осуществляют, применяя *in vitro* Mutagenesis System (систему для мутагенеза) Promega Altered Sites ® II и последовательность праймера:

R135Y: GGCACCGCCA CCTTTTACCA GTACTGGTCC (SEQ ID NO:14),
для введения мутации R135Y и получения рALT- HTX18R135Y. Плазмида показана в её родовой форме, "рALT- H(I)TXn", на Фигуре 3. Включение всех мутаций проверяют анализом ДНК последовательности.

4.6 Введение сайтов гликозилирования в положения 34, 131, 180 и 182 в HTX18:

Один раунд мутагенеза плазмиды рALT- HTX18 осуществляют, применяя *in vitro* Mutagenesis System (систему для мутагенеза) Promega Altered Sites ® II и последовательности праймеров:

T131N: CCGTCCATCG AGGGCAACGC CACCTTTCGC (SEQ ID NO: 21)

F180N: GTGGAGGGTT ACAACAGCTC TGGCTCTGCT (SEQ ID NO: 22)

F180N, S182T: GTGGAGGGTT ACAACAGCAC CGGCTCTGCT (SEQ ID NO: 23)

S182N: GGTTACTTTA GCAACGGCTC TGCTTCCATC (SEQ ID NO: 24)

S182N, S184T: GGTTACTTTA GCAACGGCAC CGCTTCCATC (SEQ ID NO: 25)

Q34N: GGTCCCGGCG GGAAC TTCTC CGTCAACTGG (SEQ ID NO: 26)

Q34N, S36T: GGTCCCGGCG GGAAC TTACAC CGTCAACTGG (SEQ ID NO: 27)

получают плазмиды pALT- ITX_n and pALT-ITX_n' (где n равно 2-5). Общая (родовая) карта этих плазмид, "pALT-H(I)TX_n", показана на Фигуре 3. Включение всех мутаций проверяют анализом ДНК последовательности.

Пример 5: Конструкция векторов, направляющих экспрессию нативных и модифицированных ксиланаз 11- го Семейства в *Trichoderma reesei*.

5.1 Конструкция pC/XHML- TV:

Фрагмент 2.4 т.н.о., содержащий промотор и сигнал секреции гена *xln2* (п.о. с - 2150 до +195, где +1 показывает ATG стартовый кодон, а +193-195 представляют собой кодон 32), амплифицируют с помощью полимеразы *Pwo* из субклона pXYN2K- 2 геномной библиотеки *xln2*, используя *xln2*- специфический праймер, содержащий *PinA1* в п.о. 190- 195 или кодонах 31 и 32, и pUC обратный праймер (Cat. No. 18432- 013, Gibco/BRL), который присоединяют даунстрим (3') от сайта *Kpn1* на 5' конце *xln2* гена. Этот *xln2* ПЦР продукт встраивают в виде фрагмента с тупыми концами в сайт *SmaI* полилинкера pUC119 в такой ориентации, что сайт *BamHI* полилинкера расположен 3' к сайту *PinAI*; это даёт плазмиду pUC/XynPSS(Pin). Тот же самый *xln2* ПЦР продукт повторно выделяют из pUC/XynPSS(Pin) расщеплением с помощью *EcoRI* (который амплифицирован как часть полилинкера pUC119 из pXYN2K-2) и *BamHI* и встраивают в плазмиду pBR322L (производную от pBR322, содержащую адаптер *Sph1- Not1- SalI* между оригинальными сайтами *Sph1* и *SalI* в п.о. 565 и 650), также расщепляемую с помощью *EcoRI* и *BamHI*, получая плазмиду pBR322LXP. Для того, чтобы облегчить экспрессию НТХ4 ксиланазы с высоким уровнем, фрагмент 1.3 т.н.о. *HindIII*, содержащий п.о. от -1400 до -121 промотора *xln2* в pBR322LXP, заменяют на фрагмент 1.2 т.н.о. *HindIII*, содержащий п.о. от -1399 до -204 промотора *cbh1*, который выделяют расщеплением pCOR132 с помощью *HindIII*; при этом получают плазмиду pBR322LXC. Наконец, затем *EcoRI* сайт плазмиды pBR322LXC достраивают с помощью фрагмента Клёнова и добавляют линкеры *SpeI* (Cat. No. 1086, New England Biolabs), получают pBR322SpXC.

Фрагмент, содержащий кодоны 1-190 гена ксиланазы, включающие мутации N10H, Y27M, N29L, выделяют из плазмиды pUC/НТХ4 (описанной выше, в Примере 4.1) расщеплением с помощью *NheI* и *BamHI*, встраивают в pCB219N-N, расщепляют с помощью *NheI* и *BamHI*, получают pНТХ4/C2ter. Для получения pCB219N-N фрагмент области терминации *cbh2* амплифицируют с помощью матрицы pZUK600 (описанной выше, в Примере 2), используя праймер, гомологичный п.о. 2226- 2242 опубликованной 3'

нетранслируемой области гена *cbh2* (Chen et al., 1987), содержащей короткий полилинкер, включающий сайты *XbaI*-*NheI*-*BamHI*-*SmaI*-*KpnI* на 5' конце, и прямой праймер pUC (Cat. No. 1224, New England Biolabs), который связывается апстрим от сайта *EcoRI* на 3' 5 конце *cbh2* в pZUK600. Этот фрагмент расщепляют по созданным сайтам *XbaI* и *EcoRI* и встраивают в соответствующие сайты pUC119, получая pCB219. Адаптер *EcoRI*-*NotI* (Cat. No. 35310-010, Gibco/BRL) встраивают в уникальный *EcoRI* сайт плазмиды pCB219, 10 получая pCB219N. Фрагмент 2.7 т.н.о., содержащий кодоны 9-190 гена НТХ4 и область терминации ("терминатор") *cbh2*, выделяют из pНТХ4/C2ter расщеплением с помощью *PinAI* и *NotI* и встраивают в pBR322SpXC, расщеплённую с помощью *PinAI* и *NotI*, 15 получая кассету экспрессии рХНМЛ-ЕС.

E. coli ген гигромицинфосфотрансферазы (*hph*), применяемый в качестве селективного маркера для *T. reesei*, амплифицируют с полимеразой *Pwo* при 20 использовании плазмиды pVU1005 (Van den Elzen et al., 1989). Праймеры созданы для введения сайтов *SphI* и *KpnI* на 5' и 3' концах кодирующей области *hph* (п.о. 211-1236 опубликованной последовательности *hph*, Gritz and Davies, 1983), соответственно. ПЦР продукт расщепляют с помощью *SphI* и *KpnI* и встраивают в соответствующие сайты в 25 полилинкерной области pUC119. Полученную плазмиду, рНРТ100, используют в качестве исходной плазмиды для конструкции кассеты селекции.

Две новых линкерных области вводят в плазмиду рНРТ100 для того, чтобы 30 упростить клонирование промоторного и терминаторного фрагментов. Линкер *HindIII*-*XbaI*-*XhoI*-*SphI* встраивают между сайтами *HindIII* и *SphI*, так же как и линкер *KpnI*-*NotI*-*SacI*, который встраивают между сайтами *KpnI* и *SacI* полилинкера pUC119, остающегося в рНРТ100. Эту конструкцию обозначают рНРТ102. Праймеры, 35 используемые для амплификации промотора *pgk* (Vanhanen et al., 1991), созданы для введения сайта *XhoI* и сайта *SphI* в положениях -970 и +1 промотора, соответственно. Эти сайты затем используют для введения промотора *pgk* в сайты *XhoI* и *SphI* плазмиды 40 рНРТ102 с образованием рНРТ115. Фрагмент 1.3 т.н.о. "терминатора" *cbhI* амплифицируют с *Pwo* полимеразой при использовании pCB1 Та, применяя праймер, отжигающийся с 3' нетранслируемой областью *cbhI* (п.о. 1864-1899 опубликованной 45 последовательности *cbhI*), содержащей сайт *KpnI* в п.о. 1877-1882 и обратный праймер pUC (Cat. No., 18432-013, Gibco/BRL), который отжигается даунстрим от сайта *EcoRI* на 3' конце области терминации *cbhI* в pCB1 Та. Полученную в результате ПЦР область терминации транскрипции *cbhI* расщепляют с помощью *KpnI* и встраивают в 50 уникальный сайт *KpnI* рНРТ11, получая плазмиду с кассетой селекции рНРТ136. Область терминации *cbhI* плазмиды с кассетой селекции рНРТ136 заменяют фрагментом

2.6 т.н.о. *KpnI*, содержащим область терминации транскрипции *xln2*. Область терминации *xln2* амплифицируют с помощью *Pwo* полимеразы при использовании субклона геномной ДНК из библиотеки рХYN2К-2, применяя праймер для введения сайта *KpnI* непосредственно даунстрим от п.о 780 опубликованной последовательности *xln2* (Saarelainen et al. 1993) и прямой праймер рUC (Cat. No. 18431- 015, Gibco/BRL), который отжигается даунстрим от 3' конца гена *xln2* в рХYN2К- 2. Область терминации транскрипции *xln2*- продукт ПЦР, расщепляют с помощью *KpnI* и лигируют с фрагментом 5.1 т.н.о. *KpnI* из рНРТ136, содержащим ген *hph* с промотором *pgk* в рUC119, получают плазмиду с кассетой селекции рНРТ136Х, таким образом сохраняя уникальный сайт *NotI* на 3' конце кассеты селекции.

Для получения вектора для трансформации экспрессионную кассету выделяют из рС/ХНМЛ- ЕС расщеплением с помощью *NotI*, присоединя (лигируя по тупым концам) сайт *NotI* с помощью ДНК полимеразы Клёнова, и расщеплением с помощью *SpeI*. В то же время получают плазмиду с кассетой селекции, чтобы принять этот фрагмент, расщеплением с помощью *XhoI*, присоединя (лигируя по тупым концам) сайт *XhoI* с помощью ДНК полимеразы Клёнова, и последующим расщеплением с помощью *XbaI*. Фрагмент *SpeI* –экспрессионная кассета-*NotI*^o встраивают между сайтами *XbaI* и *XhoI*^o апстрим (в направлении 3'- 5') от кассеты селекции рНРТ136Х. Конечный вектор для трансформации, рС/ХНМЛ-TV (Фигура 2), линейризуют, расщепляя с помощью *NotI* перед введением в *T. reesei* М2С38 бомбардировкой микрочастицами, как описано в Примере 7.

5.2 Конструкция рС/ХН(І)ТХn- TV:

Каждый *Sac I* фрагмент 3640 п.о., содержащий промоторные области, модифицированные гены *xln2* и участок области терминации транскрипции *cbh1* из рALT- Н(І)ТХn (описанный в Примере 4) клонируют в сайт *Sac I* плазмиды, содержащий остальную последовательность области терминации транскрипции *cbh2* в рSP72. В результате получают плазмиды рс/хН(І)ТХnPSP, содержащие экспрессионную кассету. Плазмиду, содержащую кассету селекции, рNCBglNSNB(r), получают с использованием плазмиды рFB6 (Radford et al, 1985), содержащей *N. crassa pyr4*. Фрагмент *Bgl II* 3.2 т.н.о. из рFB6, содержащий ген *N. crassa pyr4* (регистрационный номер в GenBank M13448), а также промотор, область терминации транскрипции и некоторые 5' UTR последовательности клонируют в сайт *Bam HI* рUC119, модифицированный таким образом, чтобы содержать сайты *Not I*, *Sma I*, *Nhe I* и *Bgl II* в полилинкере (между *Eco RI* и *Sac I*), получают рNCBgl- NSNB(r). Фрагмент 2238 п.о. *Kpn I*, содержащий полную

кодирующую область *N crassa pyr4*, промоторную последовательность и последовательность области терминации транскрипции, выделяют из pNCBgl- NSNB(r) и клонируют в уникальный сайт *Kpn I* плазмиды pс/хНТХ18PSP, получают плазмиду
 5 pс/хНТХ18- TV (плазмида показана в её общей (родовой) форме, "pс/хН(I)ТХn- TV ", на Фигуре 4).

10 5.3 Конструкция pс/хНТХ18(R135Y)-TV

Фрагмент 3640 п.о. *Sac I*, содержащий промоторные области, модифицированный ген *xln2* и часть области терминации транскрипции *cbh2* из pALT-НТХ1 8(R135Y),
 15 клонируют в сайт *Sac I* плазмиды, содержащей остальную последовательности терминации транскрипции *cbh2* в pSP72. На этой стадии получают плазмиду pс/хНУХ18(R135Y)PSP, содержащую экспрессионную кассету. Фрагмент 2238 п.о. *Kpn I*, содержащий полную кодирующую область *N. crassa pyr4*, промоторную
 20 последовательность и последовательность области терминации транскрипции, выделяют из pNCBgl- NSNB(r) (описанной в Примере 5.2, см. выше) и клонируют в уникальный сайт *Kpn I* плазмид, содержащих экспрессионную кассету, получают плазмиду
 25 pс/хНТХ18(R135Y)- TV (плазмида показана в её общей (родовой) форме, "pс/хН(I)ТХn- TV ", где "n" обозначает "18(R135Y)", на Фигуре 4).

30 5.4 Конструкция pс/хху1- TV и pс/хху1- T118N- TV

Фрагменты 675 п.о. дикого типа и модифицированных ПЦР продуктов *ху1* (Пример 3, см. выше) расщепляют с помощью *NheI* и *BamHI* и встраивают в соответствующие сайты плазмиды pCB219N- N (описанной в Примере 5.1, см. выше),
 35 получают плазмиды pX1C2ter и pX1(118N)C2ter. Фрагмент ~1.6 т.н.о., содержащий н.о. от -1399 до -204 промотора *cbh1*, п.о. от -121 до -1 промотора *xln2* и последовательность, кодирующую сигнал секреции *xln2*, амплифицируют при использовании плазмиды
 40 pBR322LXC (описанной в Примере 5.1), применяя праймеры для введения сайта *XbaI* в п.о. -1399 промотора *cbh1* и сайта *NheI* непосредственно даунстрим от кодона *Gln*, содержащего первую аминокислоту зрелого белка ксиланазы II. Этот ПЦР продукт
 45 расщепляют с помощью *XbaI* и *NheI* и встраивают апстрим от кодирующих областей нативной и модифицированной ксиланазы I в соответствующие сайты плазмид pX1C2ter и pX1(118N)C2ter, получая плазмиды с экспрессионными кассетами pс/ххуn1- ЕС и pс/ххуn1- T118N- ЕС. Экспрессионные кассеты вырезают, расщепляя с помощью *XbaI*,
 50 лигируя сайт *XbaI* с применением ДНК полимеразы Клёнова и расщепляя с помощью *EcoRI*. Плазмиду pNCBglNSNB(r) (см. выше, Пример 5.2), содержащую *N. crassa pyr4*,

получают, связывая этот фрагмент расщеплением с помощью *NotI*, соединяя сайт *NotI* с помощью ДНК полимеразы Клёнова, и расщепляя с помощью *EcoRI*. Фрагмент The *EcoRI*- хупI экспрессионная кассета-*XbaI*^o встраивают между сайтами *EcoRI* и *NotI*^o даунстрим от кассеты селекции, получают векторы для трансформации рс/ххуп1- TV и рс/ххуп1- T118N- TV (Фигура 5). Конечные векторы для трансформации линейаризуют, расщепляя с помощью *XbaI* перед введением в протопласты *T. reesei* M2C38aux5 путём опосредованной ПЭГ трансформации протопластов, описанной в Примере 7.

5.5 Конструкция рс/ххупC- T128N- TV

Плазмиду с экспрессионной кассетой ксиланазы I, рс/хх1n1- EC, расщепляют с помощью *NheI* и *KpnI* для исключения кодирующей области ксиланазы I и более длинный фрагмент лигируют с фрагментом 700 п.о. модифицированного ПЦР продукта хупC (см. выше, Пример 3), отщеплённого с помощью *NheI* и *KpnI*, получают плазмиду с кассетой экспрессии рс/ххупC- T128N- EC. Экспрессионную кассету вырезают расщеплением с помощью *NotI*, связывают сайт *NotI* с применением ДНК полимеразы Клёнова и расщепляют с помощью *XbaI*. Одновременно готовят *hph*- содержащую плазмиду, рНРТ136 (Пример 5.1, см. выше), с кассетой селекции, принимая этот фрагмент расщеплением с помощью *XhoI*, присоединением сайта *XhoI* с помощью ДНК полимеразы Клёнова и последующим расщеплением с помощью *XbaI*. Фрагмент *XbaI*- хупC экспрессионная кассета- *NotI*^o встраивают между сайтами *XbaI* и *XhoI*^o апстрим от кассеты селекции рНРТ136. Вектор для конечной трансформации, рс/ххупC- T128N- TV (Фигура 5) линейаризуют, расщепляя с помощью *XbaI* перед введением в протопласты *T. reesei* RutC30 путём опосредованной ПЭГ трансформации, описанной в Примере 7.

Пример 6: Выделение *pyr4* ауксотрофа штамма M2C38 *Trichoderma reesei*

Чтобы использовать ген *N. crassa pyr4* в качестве селективного маркера, спонтанный *pyr4* ауксотроф M2C38 выделяют следующим образом: 1×10^6 спор M2C38 засевают в минимальные среды, содержащие 5 мМ уридина и 0.15% (вес/об) уридинового аналога 5-фтороротовой кислоты (FOA), как ранее описано для селекции *pyr4* ауксотрофов *T. reesei* (Berges and Barreau, 1991). Способность расти на FOA- содержащих средах содействует отбору (селекции) мутантов, разорванных либо в гене *pyr2*, кодирующем оротатфосфорибозилтрансферазу, либо в гене *pyr4*, кодирующем оротидин 5'- фосфатдекарбоксилазу. Спонтанные FOA- резистентные колонии подвергают вторичной селекции минимальных сред в присутствии или в отсутствие уридина. Споры устойчивых к FOA колоний, которые не могут расти на минимальных средах, затем

трансформируют при использовании pNCBgINSNB(r) (Пример 5.2, см. выше) бомбардировкой микрочастицами и отбирают для выращивания на минимальных средах. Только те штаммы, которые дополнены геном *N. crassa pyr4* в pNCBgINSNB(r), растут на минимальных средах и являются истинными *pyr4* ауксотрофами. Используя эту методику, отбирают ауксотроф 5 (M2C38aux5) как стабильный *pyr4* ауксотроф штамма M2C38.

Пример 7: Трансформация *Trichoderma reesei* M2C38.

7.1 Трансформация бомбардировкой микрочастицами

Систему Biolistic PDS- 1000/He (BioRad; E.I. DuPont de Nemours and Company) используют для трансформации спор *T. reesei* штамма M2C38 и все процедуры осуществляют как рекомендовано производителем. Частицы золота (средний диаметр 0.6 мкм, BioRad Cat. No. 1652262) используют в качестве микроносителей. Для оптимизации трансформации используют следующие параметры: прочность на разрыв 1100 psi (7584 кПа), давление гелия 29 мм Hg, расстояние щели до 0.95 см, пробег микроносителя 16 мм, и расстояние до мишени 9 см. Плашки готовят с 1×10^6 спор на агаре в качестве минимальной среды (см. ниже, Пример 7.2). Плашки после бомбардировки инкубируют при 28°C. Трансформанты можно наблюдать после выращивания в течение 3- 6 дней, в это время колонии переносят на MM агар в отдельных чашках Петри и оставляют расти и спорулировать.

7.2 Трансформация протопластов с применением полиэтиленгликоля (ПЭГ) и CaCl_2 .

5×10^6 спор M2C38aux5 засевают на стерильный целлофан на картофельно-декстрозном агаре, дополненном 5 мМ уридина, и инкубируют в течение 20 часов при 30°C для того, чтобы облегчить прорастание спор и мицелиальный рост. Целлофановые диски с мицелием переносят в 10 мл раствора для получения протопластов, содержащего 7.5 г/л драйзелазы и 4 г/л бета- глюканызы (InterSpex Products Inc., Cat. Nos. 0465- 1 и 0439- 2, соответственно) в 50 мМ калийфосфатного буфера, pH 6.5, содержащего 0.6 М сульфата аммония (Буфер Р). Мицелиальный мат расщепляют в течение 5 часов при 28°C, встряхивая при 60 об/мин. Протопласты регенерируют центрифугируя при 1000-1500 x g в течение 10 мин при комнатной температуре. Протопласты отмывают с помощью 5 мл Буфера Р и снова центрифугируют при 1000-1500 x g в течение 10 мин при комнатной температуре. Протопласты ресуспендируют в 1 мл буфера STC (1.2 М сорбита, 10 мМ CaCl_2 , 10 мМ Tris- HCL, pH 7.5) и отделяют от нерасщеплённого мицелия

фильтрованием через стерильный No. 60 MIRACLOTH™ и собирают в стерильную микроцентрифужную пробирку.

Для трансформации 0.1 мл ресуспендированных протопластов (примерно, 5×10^6 протопластов) объединяют с 2 мкг векторной ДНК и 25 мкл раствора ПЭГ (25% PEG 4000, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5). После инкубации на льду в течение 30 мин прибавляют 1 мл раствора ПЭГ и смесь инкубируют в течение 5 мин при комнатной температуре. Трансформационную смесь разводят в 2 мл 1.2 М раствора сорбита в растворе ПЭГ и 0.75 мл этой смеси добавляют к 25 мл расплавленных сред MMSS агар (см. ниже), охлаждают, примерно, до 47°C и суспензию протопластов выливают в MM агар (см. ниже). Плашки инкубируют при 30°C до тех пор, пока рост колоний не станет видимым. Трансформанты переносят в индивидуальные плашки, содержащие MM агар и оставляют образовывать споры. Споры собирают и засевают при сильном разведении на MM агар для выделения гомокарионов трансформантов, которые затем помещают на PDA для того, чтобы способствовать росту и заметной споруляции для инокуляции культур для скрининга, описанной ниже, в Примере 9.

Минимальная среда (MM) агар содержит:

Реагент	На л
KH ₂ PO ₄	10 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 г
Na ₃ Citrate- 2H ₂ O	3 г
FeSO ₄ - 7H ₂ O	5 мг
MnSO ₄ - H ₂ O	1.6 мг
ZnSO ₄ - 7H ₂ O	1.4 мг
CaCl ₂ - 2H ₂ O	2 мг
Агар	20 г
20% Глюкозы f. s.	50 мл
1 M MgSO ₄ - 7H ₂ O f.s.	4 мл
pH до 5.5	

Среда MMSS агар содержит те же компоненты, что и среда MM агар, плюс 1.2 М сорбит, 4 mM MgSO₄, 1 г/л YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (азотное основание из дрожжей без аминокислот) от DEFCO Cat. No.291940) и 0.12 г/л аминокислот (-Ura DO дополнение от CLONTECH Cat. No.8601-1).

Пример 8: Определение ксиланазной активности в культуральных фильтратах *T. reesei*

Определение термофильной ксиланазной активности, обусловленной экспрессией HTX18, HTX18(R135Y), ITX1- 5 и ITX3'- 5

Наличие термофильной ксиланазной активности в культуральных фильтратах трансформантов *T. reesei* определяют, измеряя высвобождение восстанавливающих углеводов (сахаров) из растворимого субстрата арабиноксилана при 65°C. Конкретно, 30 мкг соответствующего разведения культурального фильтрата преинкубируют при 65°C в течение 5 мин. Затем 300 мкл раствора 1.5% арабиноксилана пшеницы (Megazyme International), снова растворённого в pH 7.0 фосфатном буфере, содержащем 0.04% Tween, также преинкубированного при 65°C в течение 5 мин, добавляют к образцу фермента в микроцентрифужной пробирке. Пробирки быстро встряхивают, чтобы облегчить смешение, а затем реакцию смесь инкубируют при 65°C в течение 20 мин. Реакцию ферментативного гидролиза прекращают, добавляя 150 мкл стоп- раствора, содержащего 43.64 mM 2- гидрокси- 3,5- динитробензойной кислоты, 0.93M натрия-калия тартрата, 0.4M гидроксида натрия и 0.4 M гидроксида калия. Затем полученный раствор кипятят в течение 10 минут, чтобы способствовать реакции 2- гидрокси- 3,5- динитробензойной кислоты с восстанавливающими сахарами из субстрата арабиноксилана под действием фермента. Пробирки охлаждают в бане с холодной водой в течение 5 минут, а затем добавляют 1.5 мл деионизированной воды. Оптическую плотность раствора измеряют при 530 нм. Количество восстанавливающего сахара, высвобождаемого термофильными ксиланазами в процессе инкубации, рассчитывают по стандартной кривой показателей A530 нескольких разведений раствора чистой ксилоты, реагирующей с тем же стоп-раствором.

Определение ксиланазной I активности в результате сверхэкспрессии нативной или модифицированной T. reesei xylanase I и S. lividans ксиланазы C- 131N

Обнаружение активности ксиланазы I в культуральных фильтратах штаммов *T. reesei* с повышенной экспрессией нативной или модифицированной ксиланазы I проводят как описано выше, в Разделе 8.1, за исключением того, что инкубации проводят при 40°C и 1.5% субстрат арабиноксилана пшеницы готовят в ацетатном буфере при pH 4.0, содержащем 0.04% Tween.

Обнаружение активности xylC-131N в культуральных фильтратах штаммов *T. reesei*, сверхэкспрессирующих модифицированную *S. lividans* ксиланазу C, описана в Разделе 8.1, см. выше, за исключением того, что инкубации проводят при 40°C и 1.5% субстрат арабиноксилана пшеницы готовят в ацетатном буфере при pH 6.0.

Пример 9: Продуцирование модифицированных ксиланаз в жидких культурах

Индивидуальные колонии *Trichoderma* переносят в PDA плашки для выращивания. Споруляция необходима для однородной инокуляции колб для шейкеров, которые используются для тестирования способности культуры продуцировать термофильные ксиланазы и целлюлазы. Культуральные среды содержат следующие компоненты:

Компонент	г/л
(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
CaCO ₃	10.00
Источник углерода**	5- 200
Следовые элементы*	1 мл/л

Растворы следовых элементов содержат 5 г/л FeSO₄; 1.6 г/л MnSO₄*H₂O; 1.4 г/л ZnSO₄*7H₂O.

**глюкоза, Solca floc, лактоза, софороза, кукурузный сироп или Avicel. Источник углерода можно стерилизовать отдельно в виде водного раствора при pH 2- 7 и добавлять к остальной среде сначала или в процессе ферментации.

Индивидуальные трансформанты выращивают в описанных выше средах в 150 мл культур в колбах на 1 литр или в 1 мл культур в 24-луночных микропланшетах. Начальное значение pH 5.5, и среды стерилизуют в паровом автоклаве в течение 30 минут при 121 °C перед инокуляцией. В случае как нативных, так и трансформированных клеток споры выделяют из PDA плашек как описано в Примере 8 и для инокуляции каждой культуры используют 10⁴-10⁶ спор на мл. Культуры встряхивают при 200-300 об/мин при температуре 28°C в течение 6 дней. Биомассу отделяют от фильтрата, содержащего секретированный белок, фильтруя через GF/A стеклянные микроволокнистые фильтры (Whatman) или центрифугированием при 12000 об/мин. Концентрацию белка определяют анализом белка Bio- Rad Protein Assay (Cat. No. 500-0001). Ксиланазную активность определяют как описано в Примере 8. Штаммы, экспрессирующие наивысшую ксиланазную активность из каждой конструкции и показывающие высокое общее продуцирование белка, отбирают для выращивания в пилотной установке для ферментации на 14 литров.

Пример 10: Получение ксиланаз ферментацией с периодической подпиткой в ферментёре на 14 л.

Штаммы *T. reesei* выращивают на картофельно- декстрозном агаре при 28-30°C до получения газона спор в виде монослоя. Споры собирают и используют для инокуляции 750 мл среды Беркли (Berkeley) (10 г/л глюкозы, 1.4 г/л (NH₄)₂SO₄, 2.0 г/л KH₂PO₄, 0.31

г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.53 г/л CaCl_2 ; 5.1 г/л кукурузного сиропа, 5 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.8 мг/л $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.7 мг/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в колбе с перегородкой на 2 л. После 3 дней выращивания при 28°C и 150 об/мин эту культуру используют для инокуляции 10 л ферментационной среды: 13 г/л глюкозы, 2.2 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.39 г/л KH_2PO_4 , 0.7 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.185 г/л CaCl_2 , 6 г/л кукурузного сиропа, 3.75 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1.2 мг/л $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.05 мг/л $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Аэробную ферментацию с периодической подпиткой с применением одного или более индуцирующих источников углеводов, описанных в Примере 9, проводят в течение 6 дней при pH 4.5 28-30°C в ферментёре (биореакторе) New Brunswick Microferm на 14 л. Через 6 дней культуру фильтруют через харболит и культуральный фильтрат доводят до pH 4.5 и хранят с 0.5 % бензоата для предупреждения микробного роста.

Экспрессия модифицированных ксиланаз незначительно меняет рост *Trichoderma* штаммов-хозяев, так как во всех процессах ферментации по окончании 6 дней выращивания накапливаются аналогичные количества биомассы (Таблица 3). Концентрацию биомассы в образцах из ферментёра определяют следующим образом: 5-10 г ферментационного бульона взвешивают и регистрируют. Затем ферментационный бульон фильтруют через предварительно взвешенный бумажный фильтр (Whatman) на стеклянном микроволокнистом фильтре и промывают водой. Отфильтрованную биомассу сушат в течение ночи в сушильном шкафу при 100°C. Вес сухой биомассы определяют, вычитая массу фильтра с бумагой из веса сухой биомассы плюс фильтр с бумагой. Биомассу рассчитывают следующим образом:

$$\text{Биомасса (г/л)} = \frac{\text{Масса сухой биомассы (г)}}{\text{Масса сырой биомассы (г)}} \times \text{Плотность образца (г/мл)} \times \frac{1000 \text{ мл}}{\text{л}}$$

Штаммы, продуцирующие модифицированные ксиланазы, содержащие любую из мутаций X34N, X131N, X180N или X182N (см. в Таблице 2 описание мутаций), продуцируют более высокие уровни тотального белка, нежели штаммы, продуцирующие соответствующие немодифицированные ксиланазы (Таблица 3). Концентрация белка в образцах из ферментёра ежедневно определяют, используя анализ Bio- Rad Protein Assay (Cat. No. 500- 0001).

Таблица 3: Экспрессия модифицированных ксиланаз при использовании трансформированных штаммов *T. reesei* (биомасса и ксиланазная активность)

Штамм	Enzyme	Новый N- X- S/T сайт	Белок (мг/мл)	Биомасса (г/л)	Ксиланазная активность (XU/мл)	Кратность повышения экспрессии x (% увеличения) ^b
RutC30	Нативная ксиланаза	--	40.89	30.35	812.5 ^c	--
M2C38	Нативная ксиланаза	--	23.93	18.11	141 ^a	--
P67AB	HTX18	Нет	18.9	20.1	3302	--
2013B	HTX18-R135Y	Нет	34.9	24.0	6166	1.86 x (86%)
P210A	ITX1 (T131N,R135Y)	131N	44.7	26.5	15288	4.6 x (360%) ^c 2.5x(150%) ^d
P284A	ITX2	131N	42.9	21.3	9691	2.9 x (190%)
P304B	ITX3	180N	43.2	20.5	6546	2.0 (100%)x
P321H	ITX3'	180N/182T	40.5	22.8	7192	2.2 x (120%)
P322B	ITX4	182N	39.0	20.2	11083	3.4 x (240%)
P323B	ITX4'	182N/184T	33.0	19.2	12061	3.6 x (260%)
P331B	ITX5	34N	34.5	22.5	5275	1.6 x (60%)
P336B	ITX5'	34N/36T	38.0	22.6	6933	2.1 x (110%)
P300A	Xyn1	Нет	31.0	23.2	136 ^a	-
P279A	Xyn 1-131N	118N	31.75	25.5	2042 ^a	15.0 x (1400%)
P348C	xlnC-131N	128N	35.2	23.8	2365 ^c	ND

^a измеряют при 40°C, pH 4.0

^b относительно экспрессии соответствующей немодифицированной ксиланазы, содержащей такую же первичную аминокислотную последовательность, за исключением вновь введённого мотива гликозилирования

^c эффективность экспрессии ксиланазы относительно штамма P67AB, экспрессирующего модифицированной ксиланазы, содержащей мутацию Y135R, но без 131N

^d эффективность экспрессии ксиланазы относительно штамма 2013B, экспрессирующего модифицированной ксиланазы, содержащей ни мутацию T131N, ни мутацию Y135R.

^e измеряют при 40°C, pH 6.0

Ксиланазную активность определяют как описано в Примере 8.

Штаммы P210A и P284A, содержащие генетические конструкции модифицированной ксиланазы, включающие мотив N-гликозилирования N- X- T в положениях 131-133 последовательности *T. reesei* ксиланазы II, помимо мутаций, имеющих в HTX18, продуцируют в 4.6 и в 2.9 раз более высокую ксиланазную активность, чем HTX18 штамм- продуцент, P67AB, соответственно.

Штаммы P304B и P321H, содержащие генетические конструкции модифицированной ксиланазы, включающие мотив N- гликозилирования N- X- S/T в положениях 180-182 последовательности ксиланазы II *T. reesei* помимо мутаций, имеющих в HTX18, продуцируют в два раза более высокую ксиланазную активность, чем штамм P67AB, экспрессирующий немодифицированную HTX18.

Штаммы P322B и P323B, содержащие генетические конструкции модифицированной ксиланазы, включающие мотив N-гликозилирования N- X- S/T в положениях 182- 184 последовательности ксиланазы II *T. reesei* xylanase II sequence in addition to the mutations present in HTX18, продуцируют до 3.5 раз более высокую ксиланазную активность, чем штамм P67AB, экспрессирующий немодифицированную HTX18.

Штаммы P331B и P336B, содержащие генетические конструкции модифицированной ксиланазы, включающие мотив N-гликозилирования N- X- S/T в положениях 34-36 последовательности ксиланазы II *T. reesei* помимо мутаций, имеющих в HTX18, продуцируют в 1.6 и в 2.1 раз более высокую ксиланазную активность, чем штамм P67AB, экспрессирующий немодифицированную HTX18, соответственно.

Штамм P279A, содержащий генетическую конструкцию модифицированной ксиланазы, включающую мотив N-гликозилирования N- X- T в положениях 118- 120 нативной последовательности *T. reesei* ксиланазы I, продуцирует в 15.0 раз более высокую ксиланазную активность, чем штамм P300A, экспрессирующий ксиланазу I. Эта мутация эквивалентна мутации X131N *T. reesei* ксиланазы II (см. Фигуру 1).

Штамм P348C, содержащий генетическую конструкцию модифицированной ксиланазы, включающую мотив N-гликозилирования N- X- T в положениях 128- 130 нативной последовательности *S. lividans* ксиланазы II, продуцирует равно высокие уровни ксиланазной активности, что и штамм P279A, содержащий генетическую конструкцию модифицированной ксиланазы, включающую мотив N-гликозилирования N- X- T в положениях 118-120 нативной последовательности ксиланазы I, имеющей промышленное значение для производство ксиланазы для промышленных целей. Эта мутация эквивалентна мутации X131N *T. reesei* ксиланазы II (см. Фигуру 1).

Штаммы P321H, P323B и P336B, содержащие генетические конструкции модифицированной ксиланазы, включающие мотивы N-гликозилирования N- X- T, продуцирует равно высокие уровни ксиланазной активности, что и штаммы P304B, P322B и P331B, содержащие генетические конструкции модифицированной ксиланазы, включающие мотивы N-гликозилирования N- X- S в тех же относительных положениях последовательности ксиланазы II.

Пример 11: Сравнение алкалофильности и термофильности модифицированной ксиланазы ITX1 с её нативным аналогом НТХ18

Определение активности проводят как описано в Примере 8. Для определения алкалофильности (Фигура 6) инкубационную температуру снижают до 55°C, а pH растворов Tween- 20 и NSP субстрата, содержащих фосфатный буфер, доводят до значения pH, желательных для измерения активности. Для измерения термофильности (Фигура 7) инкубационную температуру доводят до температуры, желательной для измерения активности.

Модифицированная ITX1 ксиланаза, продуцированная штаммом P210A, содержащим те же мутации, что и НТХ18, но без мутации Y135R без мутации T131N (см. Таблицу 2), имеет тот же профиль зависимости активности от pH и температуры, что и ксиланаза НТХ18 (Фигуры 6 и 7). Так, добавление T131N мутации не изменяет биохимических свойств ксиланазы, вызванных другими мутациями. Это важно для применения повышения экспрессии любой целевой ксиланазы 11-го Семейства из *Trichoderma* путём введения мутации X131N (TrX нумерация).

Пример 12: Масс-спектрометрический анализ фермента ITX1, содержащего мутацию T131N

Ферментационный фильтрат, продуцированный штаммом P210A и содержащий модифицированную ксиланазу ITX1, разводят в 2X буфере Лэммли (62.5 mM Tris- HCl pH 6.8, 10% глицерин, 2% SDS, 5% β- меркаптоэтанол), кипятят 5 мин и охлаждают. Белки отделяют с помощью SDS-PAGE, используя разрешающий гель, содержащий 12% акриламида (37.5:1 акриламид: бисакриламид, BioRad Cat. No. 161-0122), ячейку для электрофореза Mini- PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell (BioRad Cat. No. 165-3301), при 200 В (постоянное) в течение 40 мин. Белки в геле визуализируют окрашиванием с применением Bio-Safe™ красителя Кумасси (BioRad Cat. No.161-0786). Полосу белка при 20 кДа вырезают из геля, удаляют краситель и в геле расщепляют трипсином в соответствии со стандартным протоколом. Коротко говоря, полосы геля отмывают 30% раствором ацетонитрила в 100 mM растворе бикарбоната аммония, примерно, в течение 10 минут и супернатант отбрасывают. Эту процедуру повторяют до тех пор, пока краситель не удалит полностью. Полосы геля затем отмывают деионизированной водой, а потом ацетонитрилом. Примерно 20 мм 50 mM раствора бикарбоната аммония, содержащего 200 нг трипсина, добавляют к каждой полосе геля. Полосы геля оставляют снова набухать в течение 10 минут и добавляют около 30 мл 50 mM раствора бикарбоната аммония (достаточно для того, чтобы гарантировать, что полосы геля были полностью

погружены в раствор при расщеплении). Расщепление проводят в течение 4 часов, после чего жидкость из каждого образца переносят в свежую пробирку. Растворы упаривают на центрифужной вакуумной испарительной системе Savant до конечного объёма 10мл.

Растворы с продуктами расщепления анализируют наноВЭЖХ- тандемной масс-спектрометрией (nanoLC- MS/MS), используя систему CapLC (Waters), соединённую с Q-TOF2 комбинированным квадрупольным/времяпролётным масс- спектрометром (Waters). 3 мл из 10 мл растворов с продуктами расщепления впрыскивают в микрофорколону 0.3 x 5 мм C18 (Dionex/LC Packings). Пептиды остаются, тогда как соли и другие компоненты раствора вымываются. Затем "ловушку" соединяют он- лайн с колонкой 75 мм x 150 мм C18 nano-Series (нано- ряда) (Dionex/LC-Packings) и пептиды выделяют градиентной элюцией (3-45% ацетонитрила, 0.2% муравьиной кислоты в течение 35 минут с последующим быстрым повышением до 85% за 38.5 минут). Масс- спектрометр устанавливают так, чтобы он автоматически регистрировал MS/MS спектры двух- и трёхзарядных ионов. Приоритет отдаётся многозарядным ионам трипсинового пептида 123- 141 с присоединённым остатком HexNAc или без него. MS/MS спектры анализируют вручную.

Таблица 4: Детектирование гликозилирования в 131N методом LC- MS/MS

Пептид	ЖХ время удерживания	M/z двух-зарядного иона	Аминокислотная последовательность	Распределение
aa 123- 141	25.4 мин	1203.5367	VNAPSIEGN*ATFYQYWSVR + N- ацетилгексозамин	~80%
aa 123- 141	26.7 мин	1102.009	VNAPSBGNGATFYQYWSVR	~20%

Эти результаты подтверждают, что штамм- хозяин *Trichoderma* распознаёт NAT-консенсусный мотив N- гликозилирования, вводимый мутацией T131N, и что введение облегчает экспрессию с высоким уровнем модифицированной ксиланазы при использовании *Trichoderma*.

Коротко говоря, модифицированную ксиланазу, демонстрирующую повышенную эффективность экспрессии при использовании *Trichoderma*, можно создать с помощью мутации X131N (TrX нумерация). Аналогичное повышение эффективности экспрессии можно также получить, вводя другие мотивы N-X-S/T N- гликозилирования в ксиланазы 11-го Семейства в положения X34N, X180N, X182N, X34N- S36T, X180N- S182T, X182N-

S184T, или их комбинация, в эквивалентных положениях, когда ксиланазу 11- го Семейства выравнивают с TgxII, по данному описанию.

5 Настоящее изобретение описывает мутантные ксиланазы, которые проявляют повышенную экспрессию и секрецию при использовании хозяина *Trichoderma*. Эти мутантные ксиланазы можно использовать в промышленных процессах, таких как обработка пульпы и бумаги, получение кормовых добавок или в хлебопекарной и
10 пивоваренной промышленности.

Настоящее изобретение описано в отношении одного или более вариантов изобретения. Однако, для специалистов в данной области техники очевидно, что можно
15 сделать ряд вариантов и модификаций, не отступая от объёма изобретения в соответствии с Формулой изобретения.

20

25

30

35

40

45

50

ССЫЛКИ

Arase, A., Yomo, T., Urabe, I., Hata, Y., Katsube, Y. and Okada, H. (1993) FEBS Lett. 316:123- 127.

5 Berka, R.M., Kodama, K.H., Rey, 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.

10 Berges, T. and Barreau, C. (1991) Isolation of uridine auxotrophs from *Trichoderma reesei* and efficient transformation with the cloned *ura3* and *ura5* genes. Curr. Genet. 19: 359- 365.

Bissett, J. (1984) A revision of the genus *Trichoderma* I. Section Longibrachiatum Sect, nov. 15 Can. J. Bot. 62: 924- 931.

Campbell, R. L., Rose, D. R., Sung, W. L., Yaguchi, M. and Wakarchuk, W. (1995) US patent no. 5,405,769 issued on Apr. 11,1995.

20 Cannon, P. (1986) International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance, Part 2, Microb. Sci, Vol. 3.

Chen, C.M., Gritzali, M. and Stafford, D.W. (1987) "Nucleotide sequence and deduced primary structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*", Bio/Technology 5:274- 278.

25 Conesa, A., Punt, P.J., van 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

Goldman, VanMontagu and Herrera- Estrella, (1990) "Transformation of *Trichoderma* 30 *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 35 *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 25:179- 188.

Henrissat, B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 280: 309- 316.

40 Hui, J.P.M., Lanthier, P., White, T.C., McHugh, S.G., Yaguchi, M., Roy, R., and Thibault, P. (2001) Characterization of cellobiohydrolase I (*cel7a*) glycoforms from extracts of *Trichoderma reesei* using capillary isoelectric focusing and electrospray mass spectrometry. J. Chrom. B. 752:349- 368.

45 Hui, J.P.M., White, T.C, and Thibault, P. (2002) Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*. Glycobiology 12: 837- 849.

50 Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J. , Kovacs, W. Meyer, W., Petrini, O. Gams, W. Borner, T. & Kubicek, C.P. (1996) Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma*

reesei is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7755- 7760.

Kulkarni, N., Shendye, A. and Rao, M. (1999) Molecular and biotechnical aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 23:411- 456.

Lorito, Hayes, DiPietro and Harman, 1993, Biolistic Transformation of *Trichoderma harzianum* and *Gliocladium virens* using plasmid and genomic DNA. Curr. Genet. 24: 349- 356.

Luthi, E., Jasmat, N. B., and Bergquist, 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. Bacteriol. 73:269-278.

Mantyla, A., Paloheimo, M., Lantto, R., Fagerstrom, R., Lahtinen, J., Suominen, P., and Vehmaanpera, J. (2003) Sequences of Xylanase and Xylanase Expression Vectors. US 6,667,170.

Montenecourt, 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., Kaoio, J. and Suominen, P. (2003) High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. Appl. Environ. Microbiol. 69: 7073- 7082.

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.

Radford, A., Buston, F.P., Newbury, S.F. and Glazebrpok, J.A. (1985) Regulation of pyrimidine metabolism in *Neurospora*. In Molecular Genetics of Filamentous Fung: (Timberlake, W.E., editor), Alan R. Liss (New York), pages 127- 143.

Saarelainen, R., Paloheimo, M., Fagerstrom, R., Suominen, P.L., and Nevalainen, K.M.H. (1993) Cloning, sequencing and enhanced expression of the *Trichoderma reesei* endoxylanase II (pI 9), xln2. Mol. Gen. Genet. 241: 497- 503.

Sagt, C.M.J., Kleizen, B., Verwaal, R., deJong, M.D.M., Muller, 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- 4944.

Saloheimo, M., Lund, M. and Penttila, M. (1999) The protein disulphide isomerase gene of the fungus *Trichoderma reesei* is induced by endoplasmic reticulum stress and regulated by the carbon source. Mol. Gen. Genet. 262: 35- 45.

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- cellobiohydrolyase 1 derived from *Trichoderma reesei* strain L27. Bio/Technology 1: 691- 696.

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 No 5,759,840, issued on Jun. 2, 1998.

Sung, W. L., Yaguchi, M and Ishikawa, K. (1999) US patent No 5,866,408, issued on Feb. 2, 1999.

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.

Torronen, A., Mach, R.L., Messner, R., Gonzalez, R., Kalkkinen, N., Harkki, A., and Kubicek, C.P. (1992) The two major xylanases from *Trichoderma reesei*: characterization fo both enzymes and genes. Bio/technology 10:1461- 1465.

Turenen, O., Etuaho, K., Fenel, F., Vehmaanpera, J., Wu, X. Rouvinen, J., and Leisola, M. (2001) J. Biotech. 88:37- 46.

van den Brink, H., Andreasen, 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, Lehtovaara 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.

Vanhanen, Saloheimo, Ilmen, Knowles and Penttila (1991) Promoter structure and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene (pgkl) of *Trichoderma reesei*. Gene 106: 129- 133.

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.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Айоджен Био-Продакте Корпорейшн,

5 <120> Модифицированная ксиланаза

<130> V8899867RU

<140> 2006137673

<141> 2005-03-24

10

<150> US 60/556,061

<151> 2004-03-25

<160> 48

15

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 190

<212> Белок

<213> Trichoderma reesei (Tr2)

20

<400> 1

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

25

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

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

35

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

40

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

45

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

50

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

5 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

10 <210> 2
<211> 178
<212> Белок
<213> Trichoderma reesei (Tr1)

15 <400> 2

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

20 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

25 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

30 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

35 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

40 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
165 170 175

45 Val Ser Asn

<210> 3
<211> 20
<212> ДНК
<213> Искусственная

50 <220>
<223> S75A

	<400> 3 agctacctcg ccgtgtacgg	20
5	<210> 4 <211> 19 <212> ДНК <213> Искусственная	
10	<220> <223> L105H	
	<400> 4 ссассаагса сggcgaggt	19
15	<210> 5 <211> 33 <212> ДНК <213> Искусственная	
20	<220> <223> S125A	
	<400> 5 асгсгсгсг тсаасгсссс gtccatcatc ggc	33
25	<210> 6 <211> 33 <212> ДНК <213> Искусственная	
30	<220> <223> I129E	
	<400> 6 аасгссссгт ссатсгaggg сасгсссасс ttt	33
35	<210> 7 <211> 30 <212> ДНК <213> Искусственная	
40	<220> <223> Y135R	
	<400> 7 ggcacggcca cttttcgcca gtactgggtcc	30
45	<210> 8 <211> 29 <212> ДНК <213> Искусственная	
50	<220> <223> H144R	
	<400> 8 gtccgcccga accgcccgtc gagcggctc	29

	<210> 9	
	<211> 18	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
5	<220>	
	<223> N157D	
	<400> 9	
	aaccacttcg acgcgtgg	18
10	<210> 10	
	<211> 33	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
15	<220>	
	<223> Q161R	
	<400> 10	
	ttcgacgcgt gggctcgcca cggcctgacg ctc	33
20	<210> 11	
	<211> 19	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
25	<220>	
	<223> Q162H	
	<400> 11	
	ggctcagcac ggcctgacg	19
30	<210> 12	
	<211> 33	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
35	<220>	
	<223> T165H	
	<400> 12	
	gctcgccacg gcctgcacct cgggacgatg gat	33
40	<210> 13	
	<211> 30	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
45	<220>	
	<223> T131N, R135Y	
	<400> 13	
	ggcaacgcca ccttttacca gtactgggcc	30
50	<210> 14	
	<211> 30	

	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
5	<223> R135Y		
	<400> 14		
	ggcaccgcca ccttttacca gtactggtcc		30
10	<210> 15		
	<211> 30		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
15	<223> T128N		
	<400> 15		
	ccctccgtgg aaggсаасаа gaccttccag		30
20	<210> 16		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
25	<223> ХунС-5F (Nhe)		
	<400> 16		
	gccccacgссg ctagсaccat сacc		24
30	<210> 17		
	<211> 23		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
35	<223> ХунС-3R (Kpn)		
	<400> 17		
	cgtccaccgg taccaggtca acc		23
40	<210> 18		
	<211> 23		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		
	<220>		
45	<223> T118N		
	<400> 18		
	ccatccaggg caacgcgacc ttc		23
50	<210> 19		
	<211> 24		
	<212> ДНК		
	<213> Искусственная		

	<220>		
	<223> Xyn1-F		
	<400> 19		
5	cgtcgtgcta gcatcaacta cgac		24
	<210> 20		
	<211> 19		
	<212> ДНК		
10	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> Xyn1-R (BamHI)		
	<400> 20		
15	ggatcctagt tgctgacac		19
	<210> 21		
	<211> 30		
	<212> ДНК		
20	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> T131N		
	<400> 21		
25	ccgtccatcg agggcaacgc cacctttcgc		30
	<210> 22		
	<211> 30		
	<212> ДНК		
30	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> F180N		
	<400> 22		
35	gtggagggtt acaacagctc tggctctgct		30
	<210> 23		
	<211> 30		
	<212> ДНК		
40	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> F180N, S182T		
	<400> 23		
45	gtggagggtt acaacagcac cggctctgct		30
	<210> 24		
	<211> 30		
	<212> ДНК		
50	<213> Искусственная		
	<220>		
	<223> S182N		

<400> 24
ggttacttta gcaacggctc tgcttccatc 30

5 <210> 25
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

10 <220>
<223> S182N,S184T

<400> 25
ggttacttta gcaacggcac cgcttccatc 30

15 <210> 26
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

20 <220>
<223> Q34N

<400> 26
ggtcccggcg ggaacttctc cgtcaactgg 30

25 <210> 27
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная

30 <220>
<223> Q34N,S36T

<400> 27
ggtcccggcg ggaacttcac cgtcaactgg 30

35 <210> 28
<211> 189
<212> Белок
<213> Aspergillus awamori var. kawachi

<400> 28

40 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

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

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

Phe Thr Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Ser Val Tyr Gly Trp Thr Thr
 65 70 75 80
 5 Asp Pro Leu Ile Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Ser Tyr Gly Asp Tyr Asn
 85 90 95
 Pro Gly Ser Gly Gly Thr Thr Arg Gly Asn Val Ser Ser Asp Gly Ser
 100 105 110
 10 Val Tyr Asp Ile Tyr Thr Ala Thr Arg Thr Asn Ala Pro Ser Ile Gln
 115 120 125
 15 Gly Thr Ala Thr Phe Ser Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asn Lys Arg
 130 135 140
 Val Gly Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn His Phe Asn Ala Trp Ala Lys
 145 150 155 160
 20 Leu Gly Met Asn Leu Gly Thr His Asn Tyr Gln Ile Leu Ala Thr Glu
 165 170 175
 25 Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Thr Ile Gln
 180 185
 <210> 29
 <211> 184
 <212> Белок
 30 <213> Aspergillus tubingensis
 <400> 29
 Ser Ala Gly Ile Asn Tyr Val Gln Asn Tyr Asn Gly Asn Leu Gly Asp
 1 5 10 15
 35 Phe Thr Tyr Asp Glu Ser Ala Gly Thr Phe Ser Met Tyr Trp Glu Asp
 20 25 30
 40 Gly Val Ser Ser Asp Phe Val Val Gly Leu Gly Trp Thr Thr Gly Ser
 35 40 45
 Ser Asn Ala Ile Thr Tyr Ser Ala Glu Tyr Ser Ala Ser Gly Ser Ala
 50 55 60
 45 Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Val Asn Tyr Pro Gln Ala Glu Tyr
 65 70 75 80
 50 Tyr Ile Val Glu Asp Tyr Gly Asp Tyr Asn Pro Cys Ser Ser Ala Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

Ser Ala Ser Val Thr Ile Ser Ser
180 185

20

<210> 30
<211> 185
<212> Белок
<213> Bacillus circulans

25

<400> 30

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

30 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

40 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

45

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

50 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

5 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

10 Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
180 185

15 <210> 31
<211> 201
<212> Белок
<213> Bacillus pumilus
<400> 31

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

25 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

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

35 Ile Ser Ile Asn Tyr Asn Ala Ser Phe Asn Pro Gly 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

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

45 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

50 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

5 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

10 <210> 32
<211> 185
<212> Белок
<213> Bacillus subtilus

15 <400> 32

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

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

25 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

30 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

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

40 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

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

50 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

5
<210> 33
<211> 211
<212> Белок
<213> Clostridium acetobutylicum

<400> 33

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

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

20
Ser Asn Ile Gly Asn Ala Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Asp
50 55 60

25
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

30
Ser Ser Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp Gly Ser Trp
100 105 110

35
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

40
Gly Asn Thr Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg Thr Lys Arg
145 150 155 160

45
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

50
Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Lys Ala Asp Val Asn Ser Met Ser Ile Asn
195 200 205

Ile Gly Lys
210

5 <210> 34
 <211> 206
 <212> Белок
 <213> Clostridium stercorarium
 <400> 34

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

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

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

25 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 Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
 85 90 95

30 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

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

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

45 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

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

<210> 35
 <211> 211
 <212> Белок
 <213> Ruminococcus flavefaciens

5 <400> 35

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

10 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

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

20 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

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

30 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

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

40 Thr Asn Tyr Met Lys Gly Thr Ile Asp Val Thr 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

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

50 Val Ser Val
 210

<210> 36
 <211> 197
 <212> Белок
 <213> Schizophyllum commune

5 <400> 36

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

10 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

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

20 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

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

30 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

35 Lys Lys Ala Pro Gly Gly Ser Ile Ser Gly Thr Val Asp Val Gln Cys
 145 150 155 160

40 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

45 Thr Ile Thr Val Thr
 195

50 <210> 37
 <211> 189
 <212> Белок
 <213> Streptomyces sp. No. 36a

<400> 37

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

<210> 38

<211> 191

<212> Белок

45

<213> Streptomyces lividans Xyn B

<400> 38

Asp Thr Val Val Thr Thr Asn Gln Glu Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr
1 5 10 15

50

Tyr Ser Phe Trp Thr Asp Ser Gln Gly Thr Val Ser Met Asn Met Gly

	20	25	30
5	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		
10	Gly Ser Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Leu Tyr Gly Trp 65 70 75 80		
15	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		
20	Thr Tyr Asp Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Val Asn Lys Pro Ser Val Glu 115 120 125		
25	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		
30	Ala Gly Met Pro Leu Gly Asn Phe Ser Tyr Tyr Met Ile Met Ala Thr 165 170 175		
35	Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ile Asn Val Gly Gly 180 185 190		
40	<210> 39 <211> 191 <212> Белок <213> Streptomyces lividans Xyn C <400> 39		
45	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		
50	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											
5	Phe 65	Asn	Pro	Val	Gly	Asn 70	Gly	Tyr	Gly	Cys	Leu 75	Tyr	Gly	Trp	Thr	Ser 80
	Asn	Pro	Leu	Val	Glu 85	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp 90	Asn	Trp	Gly	Ser	Tyr 95	Arg
10	Pro	Thr	Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr
					100				105					110		
15	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				
20	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
25					165				170						175	
	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Gly	
				180				185					190			
30	<210>	40														
	<211>	189														
	<212>	Белок														
	<213>	Thermomonospora fusca														
	<400>	40														
35	Ala	Val	Thr	Ser	Asn	Glu	Thr	Gly	Tyr	His	Asp	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Ser
	1				5					10				15		
40	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				
45	Lys	Gly	Trp	Ala	Thr	Gly	Gly	Arg	Arg	Thr	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ser
	50						55					60				
50	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

5

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

10

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

15

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

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

20

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

25

<210> 41
<211> 190
<212> Белок
<213> Trichoderma harzianum

<400> 41

30

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

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

35

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

40

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

45

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

50

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					
5																	
	Arg	Ser	Ser	Gly	Ser	Val	Asn	Thr	Ala	Asn	His	Phe	Asn	Ala	Trp	Ala	
	145					150					155					160	
10																	
	Ser	His	Gly	Leu	Thr	Leu	Gly	Thr	Met	Asp	Tyr	Gln	Ile	Val	Ala	Val	
					165					170					175		
15																	
	Glu	Gly	Tyr	Phe	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Ile	Thr	Val	Ser			
				180					185					190			
20																	
	<210>	42															
	<211>	190															
	<212>	Белок															
	<213>	Trichoderma viride															
25																	
	Gln	Thr	Ile	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly	Phe	Asn	Asn	Gly	Tyr	Phe	Tyr	Ser	
	1				5					10					15		
30																	
	Tyr	Trp	Asn	Asp	Gly	His	Gly	Gly	Val	Thr	Tyr	Thr	Asn	Gly	Pro	Gly	
				20					25					30			
35																	
	Gly	Gln	Phe	Ser	Val	Asn	Trp	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Val	Gly	Gly	
			35					40					45				
40																	
	Lys	Gly	Trp	Gln	Pro	Gly	Thr	Lys	Asn	Lys	Val	Ile	Asn	Phe	Ser	Gly	
	50						55					60					
45																	
	Thr	Tyr	Asn	Pro	Asn	Gly	Asn	Ser	Tyr	Leu	Ser	Val	Tyr	Gly	Trp	Ser	
	65					70					75				80		
50																	
	Arg	Asn	Pro	Leu	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Glu	Asn	Phe	Gly	Thr	Tyr	
				85						90					95		
55																	
	Asn	Pro	Ser	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Leu	Gly	Glu	Val	Thr	Ser	Asp	Gly	
				100					105					110			
60																	
	Ser	Val	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Arg	Thr	Gln	Arg	Val	Asn	Gln	Pro	Ser	Ile	
		115						120					125				
65																	
	Ile	Gly	Thr	Ser	Thr	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Trp	Ser	Val	Arg	Arg	Thr	His	
	130						135					140					
70																	
	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

5

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

10

<210> 43
<211> 184
<212> Белок
<213> Aspergillus niger

15

<400> 43

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

20

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 Trp Thr Thr Gly Ser
35 40 45

25

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

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

30

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

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

35

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

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

40

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

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

45

Ser Ala Ser Val Thr Ile Ser Ser
180

50

<210> 44
<211> 184
<212> Белок
<213> Aspergillus kawachii Xyn C

<400> 44

5

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

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

10

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

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

15

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

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

20

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

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

25

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

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

30

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

Ser Ala Ser Val Thr Ile Ser Ser
180

35

<210> 45
<211> 202
<212> Белок
<213> Fibrobacter succinogenes

<400> 45

40

Asn Ser Ser Val Thr Gly Asn Val Gly Ser Ser Pro Tyr His Tyr Glu
1 5 10 15

Ile Trp Tyr Gln Gly Gly Asn Asn Ser Met Thr Phe Tyr Asp Asn Gly
20 25 30

45

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

Gly Phe Lys Tyr Asp Glu Lys His Thr Tyr Glu Glu Leu Gly Pro Ile
50 55 60

50

Asp Ala Tyr Tyr Lys Trp Ser Lys Gln Gly Ser Ala Gly Gly Tyr Asn
65 70 75 80

Tyr Ile Gly Ile Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
 85 90 95
 Ile Val Asp Asp Trp Phe Asn Lys Pro Gly Ala Asn Leu Leu Gly Gln
 100 105 110
 Arg Lys Gly Glu Phe Thr Val Asp Gly Asp Thr Tyr Glu Ile Trp Gln
 115 120 125
 Asn Thr Arg Val Gln Gln Pro Ser Ile Lys Gly Thr Gln Thr Phe Pro
 130 135 140
 Gln Tyr Phe Ser Val Arg Lys Ser Ala Arg Ser Cys Gly His Ile Asp
 145 150 155 160
 Ile Thr Ala His Met Lys Lys Trp Glu Glu Leu Gly Met Lys Met Gly
 165 170 175
 Lys Met Tyr Glu Ala Lys Val Leu Val Glu Ala Gly Gly Gly Ser Gly
 180 185 190
 Ser Phe Asp Val Thr Tyr Phe Lys Met Thr
 195 200
 <210> 46
 <211> 194
 <212> Белок
 <213> Thermomyces lanuginosus
 <400> 46
 Gln Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser
 1 5 10 15
 Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly
 20 25 30
 Gly Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly
 35 40 45
 Lys Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe Glu Gly
 50 55 60
 Val Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr
 65 70 75 80
 Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr
 85 90 95
 Asp Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly
 100 105 110
 Ser Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
 115 120 125
 Asp Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys
 130 135 140
 Arg Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala Trp Ala
 145 150 155 160
 Arg Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala

		165		170		175
	Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp					
		180		185		190
5	Val Gly					
	<210> 47					
	<211> 178					
	<212> Белок					
10	<213> Модифицированная ксиланаза I T. reesei (T131N)					
	<400> 47					
	Ala Ser Ile Asn Tyr Asp Gln Asn Tyr Gln Thr Gly Gly Gln Val Ser					
15	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					
20	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					
25	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					
30	100 105 110					
	Pro Ser Ile Gln Gly Asn 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					
35	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					
40	165 170 175					
	Ser Asn					
	<210> 48					
	<211> 191					
	<212> PRT					
45	<213> Модифицированная ксиланаза C streptomyces lividans T131N)					
	<400> 48					
	Ala Thr Thr Ile Thr Thr Asn Gln Thr Gly Thr Asp Gly Met Tyr Tyr					
50	1 5 10 15					

	Ser	Phe	Trp	Thr	Asp	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Met	Thr	Leu	Asn	Gly	
				20					25					30			
5	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					
10																	
	Phe	Asn	Pro	Val	Gly	Asn	Gly	Tyr	Gly	Cys	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Ser	
	65					70					75					80	
15	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			
20																	
	Asp	Ile	Tyr	Gln	Thr	Thr	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro	Ser	Val	Glu	Gly	Asn	
			115					120					125				
25	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	
30																	
	Ala	Gly	Met	Asn	Met	Gly	Gln	Phe	Arg	Tyr	Tyr	Met	Ile	Met	Ala	Thr	
					165					170					175		
35	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Thr	Val	Ser	Gly		
				180					185					190			

Формула изобретения

1. Модифицированная ксиланаза 11-го Семейства, содержащая
 40 последовательность, представляющую собой консенсусный сайт N-гликозилирования, отсутствующий в ксиланазе 11-го Семейства дикого типа, содержащая аминокислотную замену на аспарагин (N) в положении, выбранном из группы, состоящей из положения 34 (X34N), положения 131 (X131N), положения 180 (X180N), положения 182 (X182N), и их комбинации, причем положение определено
 45 при выравнивании последовательностей модифицированной ксиланазы 11-го Семейства с аминокислотной последовательностью ксиланазы II *Trichoderma reesei*, определенной в SEQ ID NO.1, причем модифицированная ксиланаза II 11-го Семейства получена из *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger awamori* var. *kawachii*,
 50 *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus tubingensis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium stercorarium*, *Fibrobacter succinogenes*, *Neocallimastix patriciarum*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Schizophyllum commune*, *Streptomyces* sp. No. 36a, *Streptomyces lividans* Xyn B, *Streptomyces lividans* Xyn

C, *Thermomonospora fusca*, *Thermomyces lanuginosus*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei* XynI, *Trichoderma reesei* XynII или *Trichoderma viride*.

2. Модифицированная ксиланаза по п.1, содержащая замену X131N.

3. Модифицированная ксиланаза по п.1, отличающаяся тем, что она представляет собой *Trichoderma* ксиланазу.

4. Модифицированная ксиланаза по п.3, отличающаяся тем, что ксиланаза *Trichoderma* представляет собой ксиланазу I или ксиланазу II из *Trichoderma reesei*.

5. Модифицированная ксиланаза по п.1, представляющая собой *S. lividans* ксиланазу C, определенную в SEQ ID NO.39, содержащую аминокислотную замену T131N, причем положение определено при выравнивании последовательностей *S. lividans* ксиланазы C с аминокислотной последовательностью ксиланазы II *Trichoderma reesei*, определенной в SEQ ID NO.1.

6. Модифицированная ксиланаза по п.1, представляющая собой *Trichoderma reesei* ксиланазу I, определенную в SEQ ID NO.2, содержащую аминокислотную замену T131N, причем положение определено при выравнивании последовательностей *Trichoderma reesei* ксиланазы I с аминокислотной последовательностью ксиланазы II *Trichoderma reesei*, определенной в SEQ ID NO.1.

7. Модифицированная ксиланаза 11-го Семейства, содержащая последовательность, представляющую собой консенсусный сайт N-гликозилирования, отсутствующий в ксиланазе 11-го Семейства дикого типа, представляющая собой ксиланазу II *Trichoderma reesei*, определенную в SEQ ID NO.1,

и выбранную из группы, состоящей из: N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, T131N, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R, представленную как ITX1, N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, T131N, Y135R, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R, представленную как ITX2,

N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R и F180N, представленную как ITX3,

N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R, F180N и S182T, представленную как ITX3',

N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R и S182N, представленную как ITX4,

N10H, Y27M, N29L, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H, T165R, S182N и S184T, представленную как ITX4',

N10H, Y27M, N29L, Q34N, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R, представленную как ITX5, и

N10H, Y27M, N29L, Q34N, S36T, S75A, L105H, Q125A, I129E, H144R, N157D, Q161R, Q162H и T165R, представленную как ITX5'.

8. Генетическая конструкция, экспрессирующая модифицированную ксиланазу 11-го Семейства, содержащая промотор, функционально связанный с сигналом секреции, который функционально связан с кодирующей областью, которая кодирует модифицированную ксиланазу по п.1.

9. Генетическая конструкция по п.8, отличающаяся тем, что сигнал секреции генетической конструкции модифицированной ксиланазы представляет собой сигнал секреции *Trichoderma*.

10. Генетическая конструкция по п.9, отличающаяся тем, что сигнал секреции *Trichoderma* представляет собой сигнал секреции ксиланазы.

11. Генетическая конструкция по п.10, отличающаяся тем, что сигнал секреции

представляет собой сигнал секреции ксиланазы I *Trichoderma* или сигнал секреции ксиланазы II *Trichoderma*.

12. Генетическая конструкция по п.9, отличающаяся тем, что промотор выбирают из группы, состоящей из *Trichoderma* cbh1 промотора, cbh2 промотора, eg1 промотора, eg2 промотора, eg3 промотора, eg5 промотора, xln1 промотора и xln2 промотора и комбинации двух или более из этих промоторов.

13. Генетически модифицированный микроорганизм, содержащий генетическую конструкцию по п.8 и предназначенный для экспрессии модифицированной ксиланазы 11-го Семейства.

14. Генетически модифицированный микроорганизм по п.13, отличающийся тем, что этот микроорганизм относится к роду *Trichoderma* или *Humicola*.

15. Генетически модифицированный микроорганизм по п.13, отличающийся тем, что промотор выбирают из группы, состоящей из *Trichoderma* cbh1 промотора, cbh2 промотора, eg1 промотора, eg2 промотора, eg3 промотора, eg5 промотора, xln1 промотора и xln2 промотора и комбинации двух или более из этих промоторов.

16. Способ обработки продукта питания, применяемого в хлебопекарной или пивоваренной промышленности, заключающийся в обработке его модифицированной ксиланазой 11-го Семейства по п.1.

17. Способ обработки кормовой добавки для птицы или свиней, заключающийся в ее обработке модифицированной ксиланазой 11-го Семейства по п.1.

18. Способ производства бумажной пульпы, заключающийся в обработке пульпы модифицированной ксиланазой 11-го Семейства по п.1.

Ca	1				S	AFNTQAAP	9
Cs	1					G	1

Tr2#		10	20	30	40	
Bp	1	RTITNNEMGN	HSGYDYELWK	DYGNT-SMTL	NNGGAFSAGW	N--NIGNA 45
Ca	10	KTITSNEIGV	NGGYDYELWK	DYGNT-SMTL	KNGGAFSCQW	S--NIGNA 54
Fs	1	NSSVTGNVG	SSPYHYEIWY	QGG-NNSMTF	YDNGTYKASW	N--GTNDF 44
Cs	2	RIIYDNETGT	HGGYDYELWK	DYGNT-IMEL	NDGGTFSCQW	S--NIGNA 46
Rf	1	SAADQQTRGN	VGGYDYEMWN	QNGQCQASMN	PGAGSFTCSW	S--NIENF 46
Tr2	1	QTIQPGTGY	NNGYFYSYWN	DGHGGVITYN	GPGGQFSVNW	S--NSGNF 45
Tv	1	QTIGPGTGF	NNGYFYSYWN	DGHGGVITYN	GPGGQFSVNW	S--NSGNF 45
Th	1	QTIGPGTGY	SNGYYYSYWN	DGHAGVITYN	GGGGSFTVNW	S--NSGNF 45
Sc	1	SGTPSSTGT	DGGYYYSWWT	DGAGDATYQN	NGGGSYTLTW	SG--NNGNL 46
An	1		S AGINYVQNYN	GNLGDFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF 38
Ak	1		S AGINYVQNYN	GNLADFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF 38
At	1		S AGINYVQNYN	GNLGDFTY-D	ESAGTFSMYW	EDGVSSDF 38
Tr1	1		ASINYDQNYQ	TGG-QVSY-	PSNTGFSVNW	N--TQDDF 34
Aa	1	RSTPSSTGE	NNGYYYSFWT	DGGGDVITYN	GNAGSYSVEW	S--NVGNF 45
Ss	1	ATTIT-NETGY	D-GMYYSFWT	DGGGSVSMTL	NGGGSYSTRW	T--NCGNF 45
SlB	1	DTVVTNQEQT	NNGYYYSFWT	DSQGTVMNM	GSGGQYSTSW	R--NTGNF 47
SlC	1	ATTITTNTGT	D-GMYYSFWT	DGGGSVSMTL	NGGGSYSTQW	T--NCGNF 46
Tl	1	QTTPNSEGW	HDGYYYSWWS	DGGAQATYTN	LEGGTYEISW	G--DGGNL 45
Tf	1	AVTSNETGY	HDGYFYSFWT	DAPGTVSMEL	GPGGNYSTSW	R--NTGNF 45
Bc	1		ASTDYWQNWT	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNW	S--NTGNF 36
Bs	1		ASTDYWQNWT	DGGGIVNAVN	GSGGNYSVNW	S--NTGNF 36

Фиг. 1

Tr2#		50		60		70		80	
Bp	46	LFRK- <u>G</u> KKFD	ST-RTHHQLG	NISINYNASF	N-PGGNSYLC	<u>VY</u> GWTSQSP	90		
Ca	55	LFRK- <u>G</u> KKFN	DT-QTYKQLG	NISVNYNCNY	Q-PYGN SYLC	<u>VY</u> GWTS SSP	99		
Fs	45	LARV- <u>G</u> FKYD	EK-HTYEELGP	IDAYYKWSKQ	GSAGGYNYIG	<u>IY</u> GWTVDP	91		
Cs	47	LFRK- <u>G</u> RKFN	SD-KTYQELG	DIVVEYGCDY	N-PNGNSYLC	<u>VY</u> GWTRNP	91		
Rf	47	LARM- <u>G</u> KNYD	SQKKNYKAFG	NIVLTYDVEY	T-PRGN SYMC	<u>VY</u> GWTRNP	92		
Tr2	46	VGGK- <u>G</u> WQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNGNSYLS	<u>VY</u> GWSRNP	83		
Tv	46	VGGK- <u>G</u> WQPG	TKNKV-----	---INFS-GT	YNPNGNSYLS	<u>VY</u> GWSRNP	83		
Th	46	VGGK- <u>G</u> WQPG	TKNKV-----	---INFS-GS	YNPNGNSYLS	<u>IY</u> GWSRNP	83		
Sc	47	VGGK- <u>G</u> WNPG	AASRS-----	---ISYS-GT	YQPNGNSYLS	<u>VY</u> GWTRSS	84		
An	39	VVGL- <u>G</u> WTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSSSYLA	<u>VY</u> GWVNYP	76		
Ak	39	VVGL- <u>G</u> WTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSSSYLA	<u>VY</u> GWVNYP	76		
At	39	VVGL- <u>G</u> WTTG	SSNA-----	---ITYSAEY	SASGSASYLA	<u>VY</u> GWVNYP	76		
Tr1	35	VVG- <u>G</u> WTTG	SSAP-----	---INFGGSF	SVNSGTGLLS	<u>VY</u> GWSTNP	72		
Aa	46	VGGK- <u>G</u> WNPG	SAKD-----	---ITYSGNF	T-PSGNGYLS	<u>VY</u> GWTTDP	82		
Ss	46	VAGK- <u>G</u> WANG	GR-RT-----	---VRYT-GW	FNPSGNGYGC	<u>LY</u> GWTSNP	82		
SlB	48	VAGK- <u>G</u> WANG	GR-RT-----	---VQYS-GS	FNPSGNAYLA	<u>LY</u> GWTSNP	84		
SlC	47	VAGK- <u>G</u> WSTG	DGN-----	---VRYN-GY	FNPPVGNNGYGC	<u>LY</u> GWTSNP	82		
Tl	46	VGGK- <u>G</u> WNPG	LNARA-----	---IHFE-GV	YQPNGNSYLA	<u>VY</u> GWTRNP	83		
Tf	46	VAGK- <u>G</u> WATG	GR-RT-----	---VTYS-AS	FNPSGNAYLT	<u>LY</u> GWTRNP	82		
Bc	37	VVGK- <u>G</u> WTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNGNGYLT	<u>LY</u> GWTRSP	75		
Bs	37	VVGK- <u>G</u> WTTG	SPFRT-----	---INYNAGV	WAPNGNGYLT	<u>LY</u> GWTRSP	75		

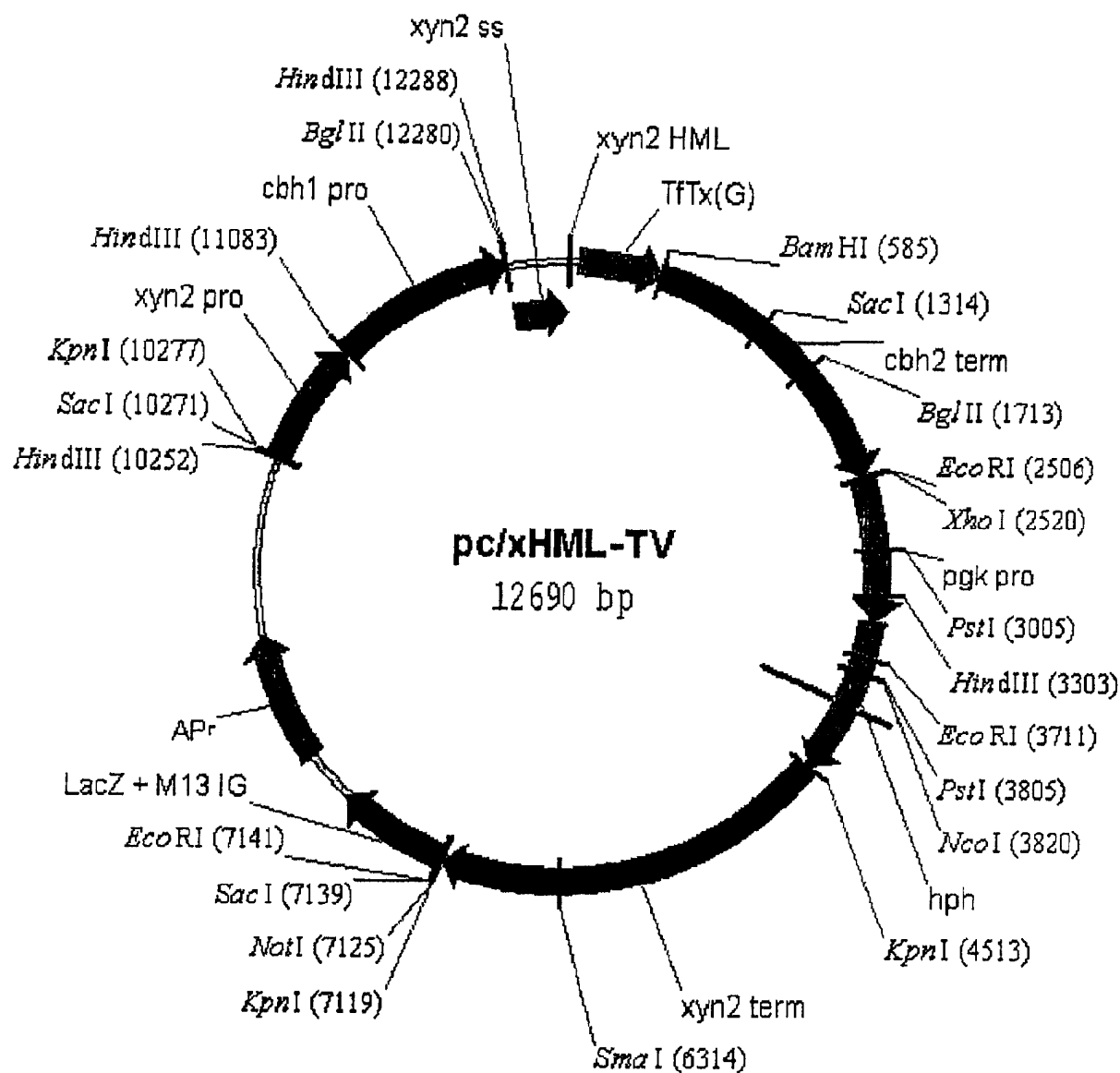
Tr2#		90		100		110		120		130
Bp	91	LAEYYIVDSW	GTyr-PT--G	AYKGSFYADG	GTyDIYETTR	VNQP SIIG	135			
Ca	100	LVEYYIVDSW	GSWRPP--GG	TSKGTITVDG	GIYDIYETTR	INQP SIQG	145			
Fs	92	LVEYYIVDDW	FNKPGAMLLG	QRKGEFTVDG	DTYEIWQNT	VQQP SIKG	139			
Cs	92	LVEYYIVESW	GSWRPP--GA	TPKGTITQWMAG	TYEIIYETTR	VNQP SIDG	138			
Rf	93	LMEYYIVEGW	GDWRPPGNDG	EVKGTVSANG	NTYDIRKTMR	YNQP SLDG	140			
Tr2	84	LIEYYIVENF	GTYN-PTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTQR	VNQP SIIG	130			
Tv	84	LIEYYIVENF	GTYN-PTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTQR	VNQP SIIG	130			
Th	84	LIEYYIVENF	GTYN-PTGA	TKLGEVTS DG	SVYDIYRTQR	VNQP SIIG	130			
Sc	85	LIEYYIVESY	GSYD-PSSAA	SHKGSVTCNG	ATYDILSTWR	YNAP SIDG	131			
An	77	GAEYYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYSDG	STYQVCTDTR	INEP SITG	123			
Ak	77	QAEYYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYSDG	STYQVCTDTR	TNEP SITG	123			
At	77	QAEYYIVEDY	GDYN-PCSSA	TSLGTVYSDG	STYQVCTDTR	TNEP SITG	123			
Tr1	73	LVEYYIMEDN	HNY--PAQ-G	TVKGTVTSDG	ATYTIWENTR	VNEP SIQG	117			
Aa	83	LIEYYIVESY	GDYN-PGSGG	TTRGNVSSDG	SVYDIYTATR	TNAP SIQG	129			
Ss	83	LVEYYIVDNW	GSYR-PT--G	ETRGTVHSDG	GTyDIYKTTR	YNAP SVEA	127			
SlB	85	LVEYYIVDNW	GTyr-PT--G	EYKGTVTSDG	GTyDIYKTTR	VNKP SVEG	129			
SlC	83	LVEYYIVDNW	GSYR-PT--G	TYKGTVSSDG	GTyDIYQTTR	YNAP SVEG	127			
Tl	84	LVEYYIVENF	GTyD-PSSGA	TDLGTVECDG	SIYRLGKTTR	VNAP SIDG	130			
Tf	83	LVEYYIVESW	GTyr-PT--G	TYMGTVTTDG	GTyDIYKTTR	YNAP SIEG	127			
Bc	76	LIEYYVVD SW	GTyr-PT--G	TYKGTVKSDG	GTyDIYTTR	YNAP SIDG	120			
Bs	76	LIEYYVVD SW	GTyr-PT--G	TYKGTVKSDG	GTyDIYTTR	YNAP SIDG	120			

Фиг. 1 (продолжение)

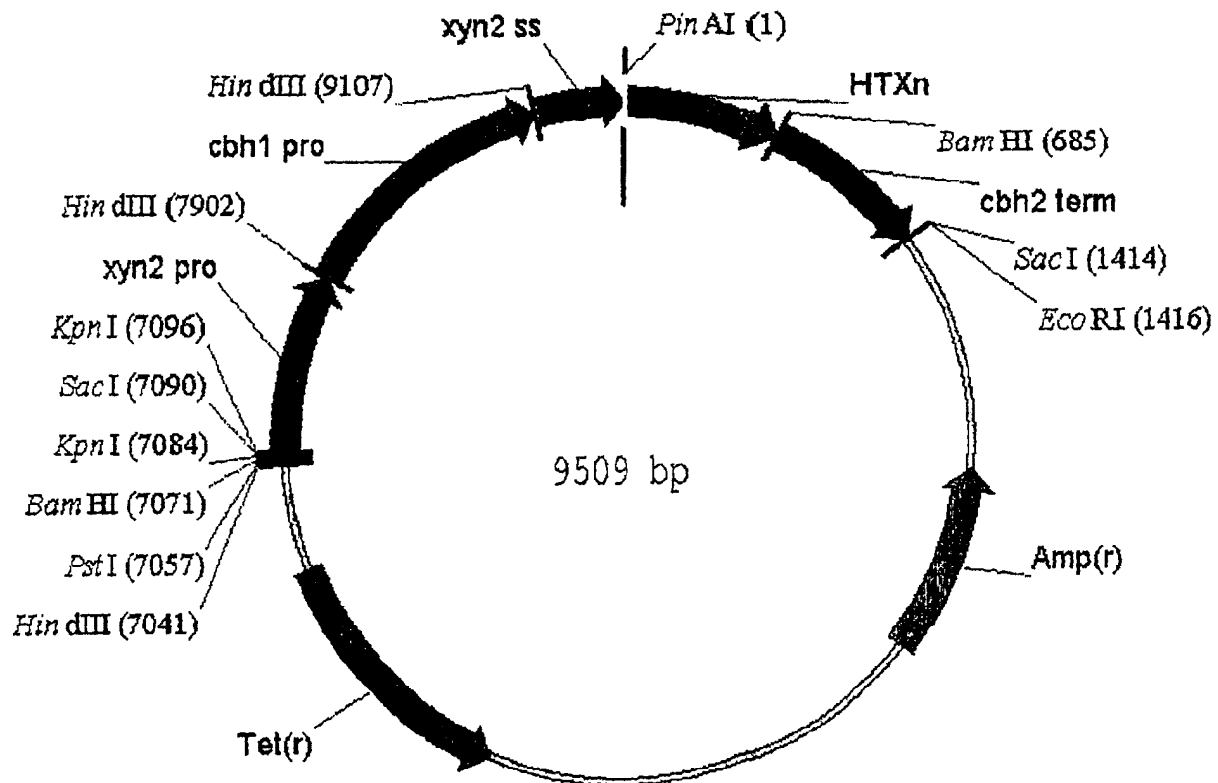
Tr2#		140	150	160	
Bp	136	-IAT <u>TFKQYWS</u>	<u>VRQTKRTS</u> --	----- <u>GT</u> VS	VSA <u>HFRKWES</u> <u>LG</u> MPM-GK 173
Ca	146	-NT <u>TFKQYWS</u>	<u>VRRTKRTS</u> --	----- <u>GT</u> IS	VSK <u>HFAAWES</u> <u>KG</u> MPL-GK 183
Fs	140	-TQ <u>TFPQYFS</u>	<u>VRKSARSC</u> --	----- <u>GH</u> ID	ITA <u>HMKKWE</u> E <u>LG</u> MKM-GK 177
Cs	139	-TAT <u>TFQYWS</u>	<u>VRTSKRTS</u> --	----- <u>GT</u> IS	VTE <u>HFKQWER</u> <u>MG</u> MRM-GK 176
Rf	141	-TAT <u>TFPQYWS</u>	<u>VRQTS</u> GSANN	QTNYMK <u>GT</u> ID	VT <u>KHFD</u> AWSA <u>AG</u> LDMSGT 187
Tr2	131	-TAT <u>TFYQYWS</u>	<u>VRRNHR</u> -S-S	----- <u>GS</u> VN	TAN <u>HFN</u> AWAQ <u>QG</u> LTTL-GT 168
Tv	131	-TST <u>TFYQYWS</u>	<u>VRRTHR</u> -S-S	----- <u>GS</u> VN	TAN <u>HFN</u> AWAQ <u>QG</u> LTTL-GT 168
Th	131	-TAT <u>TFYQYWS</u>	<u>VRRNHR</u> -S-S	----- <u>GS</u> VN	TAN <u>HFN</u> AWAS <u>HG</u> LTTL-GT 168
Sc	132	-TQ <u>TFEQFWS</u>	<u>VRNPKKAPGG</u>	SIS-- <u>GT</u> VD	VQ <u>CHFD</u> AWKG <u>LG</u> MNLGSE 175
An	124	-TST <u>FTQYFS</u>	<u>VRESTRTS</u> --	----- <u>GT</u> VT	VAN <u>HFN</u> FWAQ <u>HG</u> FGN-SD 161
Ak	124	-TST <u>FTQYFS</u>	<u>VRESTRTS</u> --	----- <u>GT</u> VT	VAN <u>HFN</u> FWAQ <u>HG</u> FGN-SD 161
At	124	-TST <u>FTQYFS</u>	<u>VRESTRTS</u> --	----- <u>GT</u> VT	VAN <u>HFN</u> FWAH <u>HG</u> FGN-SD 161
Tr1	118	-TAT <u>FNQYIS</u>	<u>VRNSPR</u> -T-S	----- <u>GT</u> VT	VQ <u>NHFN</u> AWAS <u>LG</u> LHLGQM 156
Aa	130	-TAT <u>FSQYWS</u>	<u>VRQNK</u> R-VG-	----- <u>GT</u> VT	TSN <u>HFN</u> AWAK <u>LG</u> MNL-GT 167
Ss	128	-PAA <u>FDQYWS</u>	<u>VRQSKVT</u> --S	----- <u>GT</u> IT	TGN <u>HFD</u> AWAR <u>AG</u> MNMGNF 166
SlB	130	TR- <u>TFDQYWS</u>	<u>VRQSKR</u> -TG-	----- <u>GT</u> IT	TGN <u>HFD</u> AWAR <u>AG</u> MPLGNF 168
SlC	128	TK- <u>TFQYWS</u>	<u>VRQSKVTSGS</u>	----- <u>GT</u> IT	TGN <u>HFD</u> AWAR <u>AG</u> MNMQF 168
Tl	131	TQ- <u>TFDQYWS</u>	<u>VRQDKR</u> -T-S	----- <u>GT</u> VQ	TG <u>CHFD</u> AWAR <u>AG</u> LNNGD 169
Tf	128	TR- <u>TFDQYWS</u>	<u>VRQSKRTS</u> --	----- <u>GT</u> IT	AGN <u>HFD</u> AWAR <u>HG</u> MHLGTH 166
Bc	121	DRT <u>TF</u> <u>QYWS</u>	<u>VRQSKRPTGS</u>	N----- <u>AT</u> IT	FTN <u>HVN</u> AWKS <u>HG</u> MNLGSN 163
Bs	121	DRT <u>TF</u> <u>QYWS</u>	<u>VRQSKRPTGS</u>	N----- <u>AT</u> IT	FSN <u>HVN</u> AWKS <u>HG</u> MNLGSN 163

Tr2#		170	180	190	
Bp	174	MYETAFTV <u>EG</u>	<u>YQSSGS</u> ANVM	TNQLFIGN	201
Ca	184	MHETAFNI <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> KADV N	SMSINIGK	211
Fs	178	MYEAKVLV <u>EA</u>	GGG <u>SGS</u> FDV-	TYFKMT	202
Cs	177	MYEVALTV <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> YANVY	KNEIRIGANP	206
Rf	188	LYEVS LN <u>IEG</u>	<u>YRSNG</u> SANVK	SVSV	211
Tr2	169	MDYQIVAV <u>EG</u>	<u>YFSSGS</u> SASI-	TVS	190
Tv	169	MDYQIVAV <u>EG</u>	<u>YFSSGS</u> SASI-	TVS	190
Th	169	MDYQIVAV <u>EG</u>	<u>YFSSGS</u> SASI-	TVS	190
Sc	176	HNYQIVAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> TATI-	TVT	197
An	162	FNYQVM <u>AVEA</u>	WSGAG <u>SASV</u> -	TISS	184
Ak	162	FNYQVM <u>AVEA</u>	WSGAG <u>SASV</u> -	TISS	184
At	162	FNYQVV <u>AVEA</u>	WSGAG <u>SASV</u> -	TISS	184
Tr1	157	-NYQVVAV <u>EG</u>	WGG <u>SGS</u> SASQ-	SVSN	178
Aa	168	HNYQILAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSSI-	TIQ	189
Ss	167	RYYMINAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSTI-	TVSG	189
SlB	169	SYYMIMAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSSI-	NVGG	191
SlC	169	RYYMIMAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNI-	TVSG	191
Tl	170	HYYQIVAT <u>EG</u>	<u>YFSSG</u> YARI-	TVADVG	194
Tf	167	D-YMIMAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNVT	LGTS	189
Bc	164	WAYQVMAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNV-	TVW	185
Bs	164	WAYQVMAT <u>EG</u>	<u>YQSSG</u> SSNV-	TVW	185

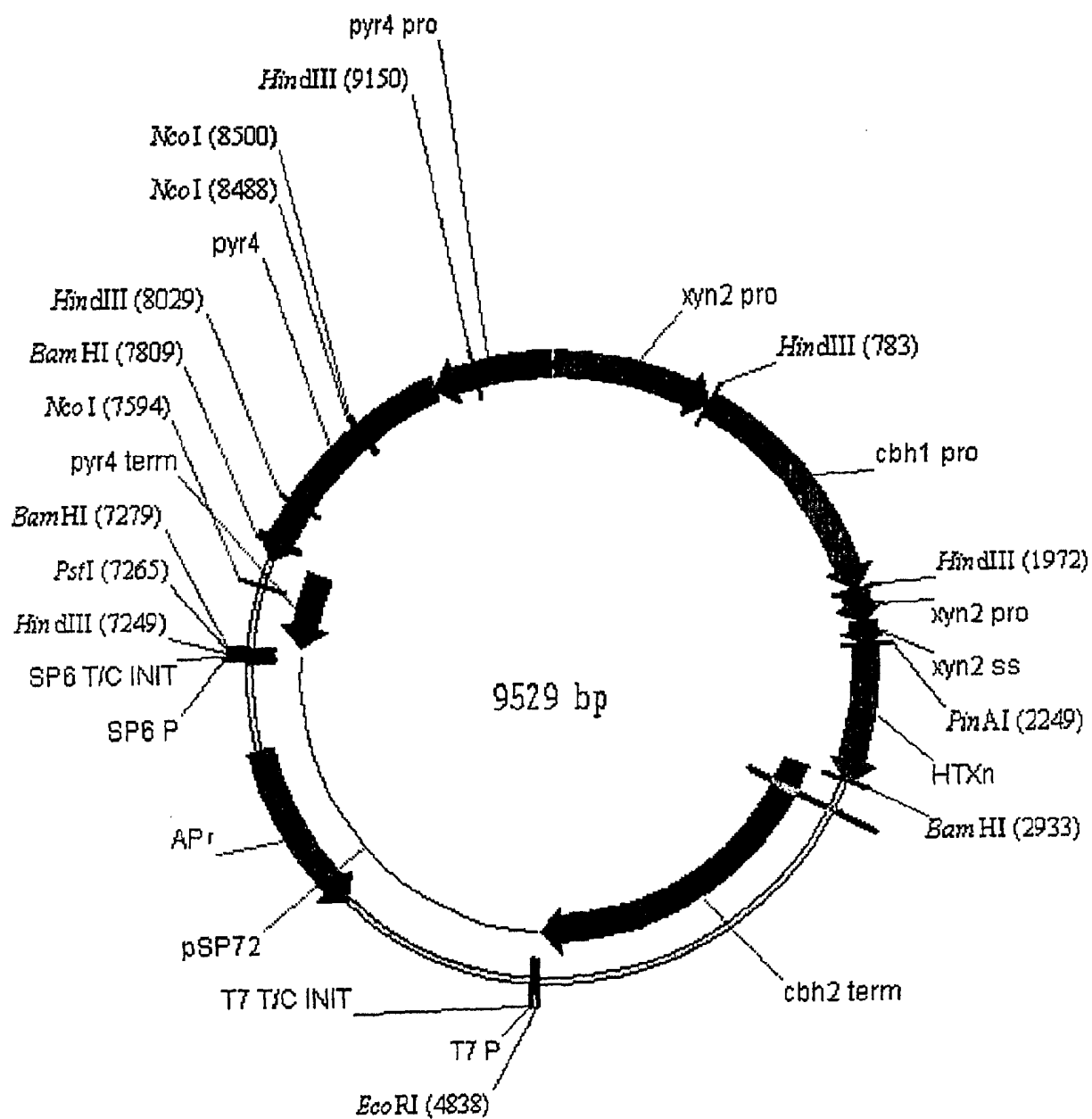
Фиг. 1 (продолжение)



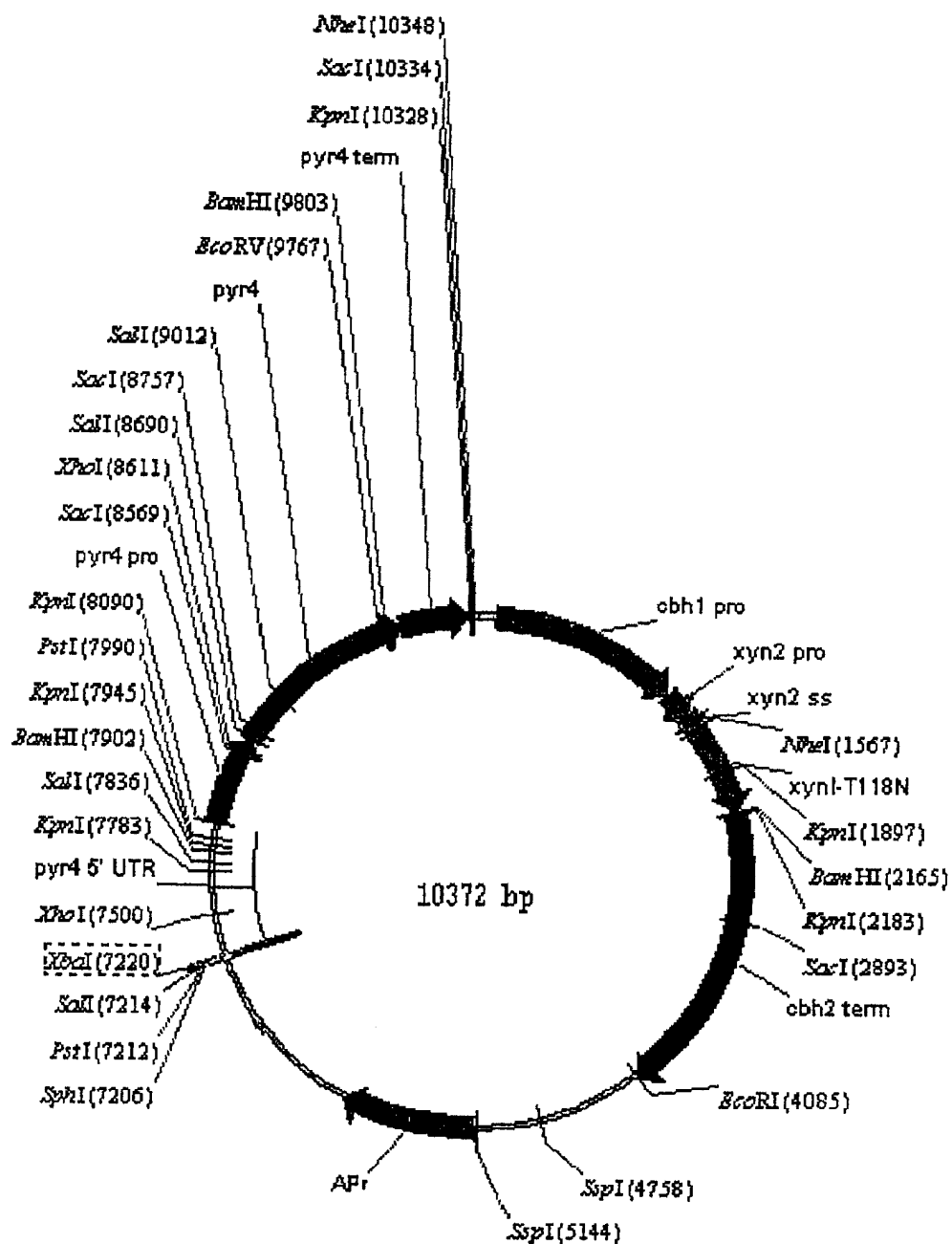
Фиг. 2



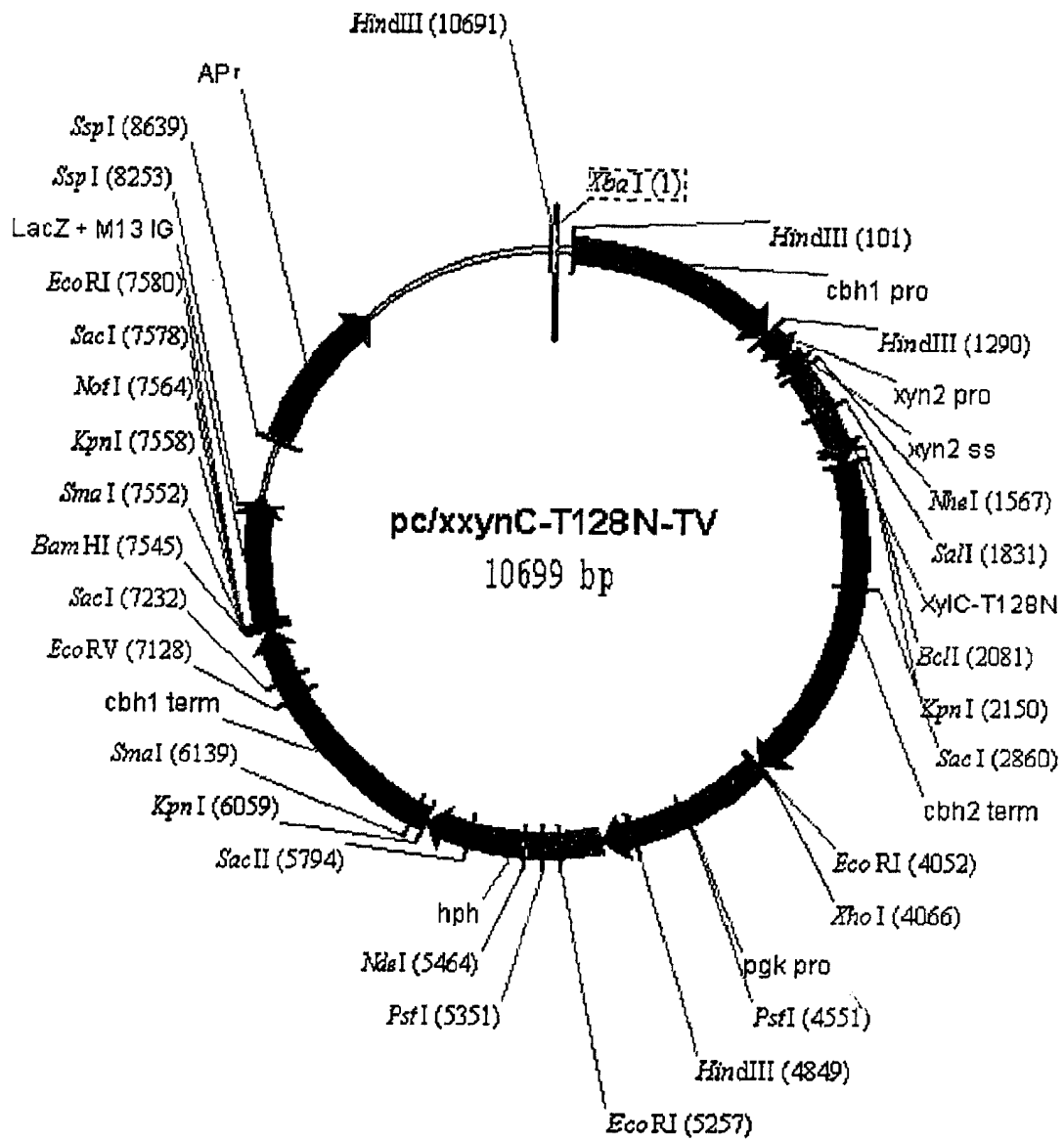
Фиг. 3



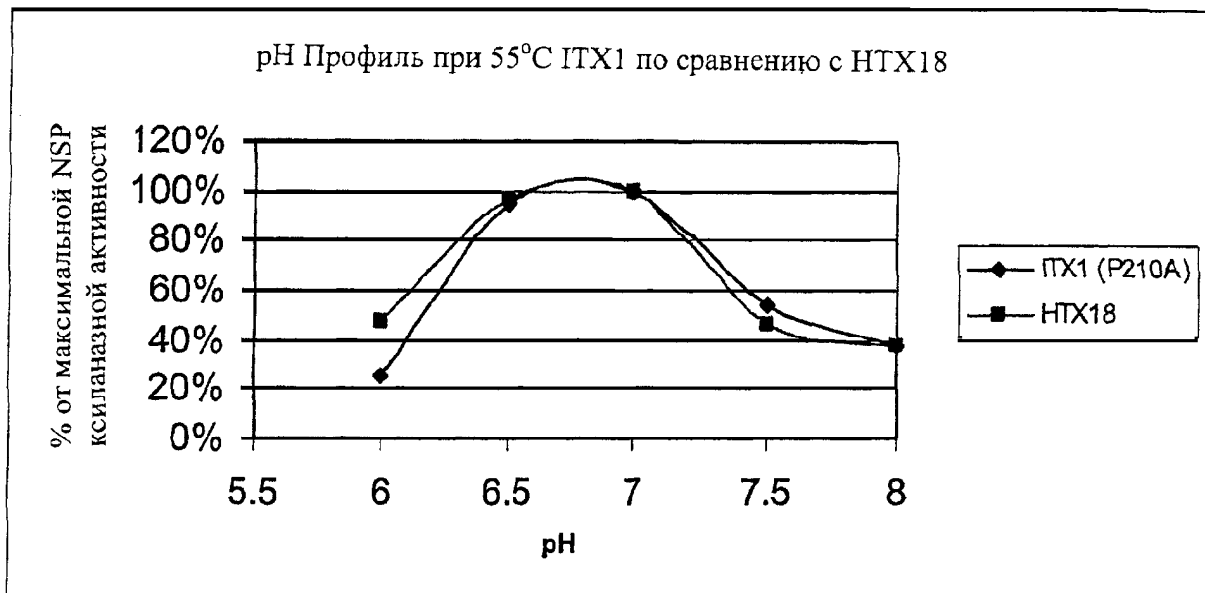
Фиг. 4



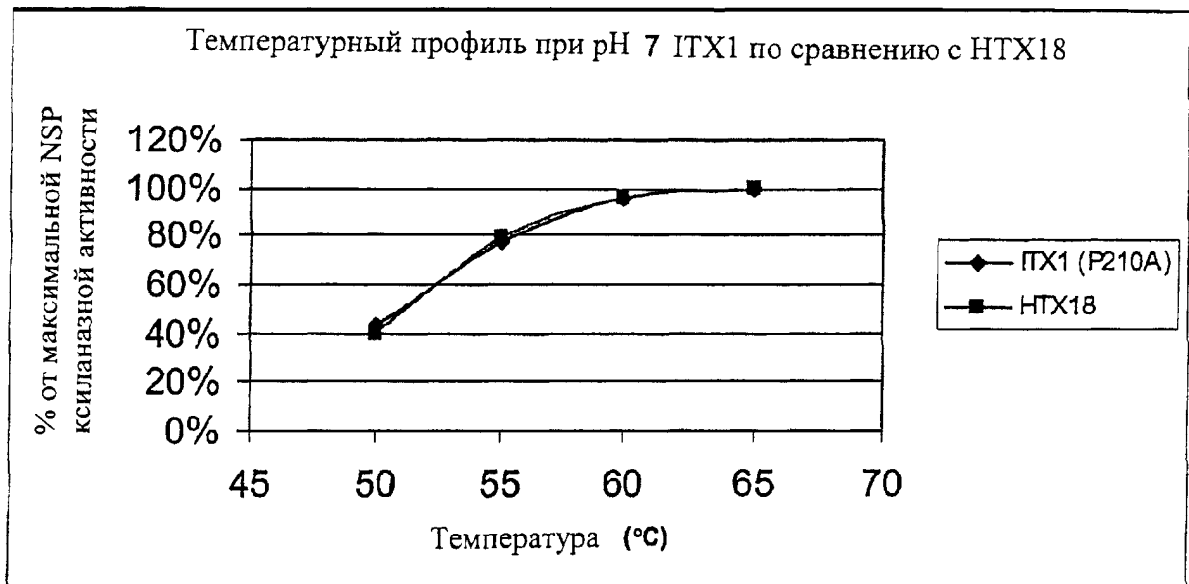
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 6



Фиг. 7