

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010143039/10, 20.03.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.03.2009

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.03.2008 US 61/038,520

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2012 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 20.12.2014 Бюл. № 35

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2277345 C1, 10.06.2006 . US
20070218530 A1, 20.09.2007 . US 0006132727
A1, 17.10.2000 . Sorensen HR et al., Enzymatic
hydrolysis of water-soluble wheat arabinoxylan.
1. Synergy between alpha-L-
arabinofuranosidases, endo-1,4-beta-xylanases,
and beta-xylosidase activities, Biotechnol
Bioeng., 2003 Mar 20, Vol.81, No:6, p.p.726-31.(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 21.10.2010(86) Заявка РСТ:
US 2009/037853 (20.03.2009)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/117689 (24.09.2009)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"(54) КОМПОЗИЦИЯ ФЕРМЕНТНОЙ СМЕСИ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА СМЕСИ ЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ И
ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗНЫХ МАТЕРИАЛОВ (ВАРИАНТЫ) И СПОСОБЫ ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
(ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Описаны композиции ферментной смеси для гидролиза смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов и способы гидролиза таких смесей. Представленные ферментные смеси включают три композиции, первая из которых содержит смесь цельной целлюлазы *T.reesei*, дополненную β -глюкозидазой

(72) Автор(ы):

ПАУЭР Скотт Д. (US),
КОЛДУЭЛЛ Роберт М. (US),
ЛАНТИ Сьюзанн Е. (US),
ЛАРЕНАС Эдмунд А. (US)(73) Патентообладатель(и):
ДАНИСКО ЮЭс ИНК. (US)R U
2 5 3 6 2 5 6
C 2
C 6
C 5
C 3
C 2
UR U
2 5 3 6 2 5 6
C 2

T. reesei BGLU1, вторая композиция состоит из по меньшей мере одной ксиланазы, выбранной из ксиланазы GH10 или GH11, и третья композиция состоит из по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы, которая представляет собой сочетание β -ксилозидазы и двух или более арабинофуранозидаз.

R U 2 5 3 6 2 5 6 C 2

Представленные способы предусматривают контактирование смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов с указанными композициями. Охарактеризованные изобретения

позволяют повысить конверсию глюкана и ксилана и могут быть использованы при превращении биомассы в сахар. 4 н. и 8 з.п. ф-лы, 10 табл.

R U 2 5 3 6 2 5 6 C 2

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2010143039/10, 20.03.2009

(24) Effective date for property rights:
20.03.2009

Priority:

(30) Convention priority:
21.03.2008 US 61/038,520

(43) Application published: 27.04.2012 Bull. № 12

(45) Date of publication: 20.12.2014 Bull. № 35

(85) Commencement of national phase: 21.10.2010

(86) PCT application:
US 2009/037853 (20.03.2009)(87) PCT publication:
WO 2009/117689 (24.09.2009)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij Partnery"

(72) Inventor(s):

PAUEhR Skott D. (US),
KOLDUEhLL Robert M. (US),
LANTTs S'juzann E. (US),
LARENAS Ehdmund A. (US)

(73) Proprietor(s):

DANISKO JuEhs INK. (US)

R U
2 5 3 6 2 5 6
C 2

(54) COMPOSITION OF ENZYME MIXTURE FOR HYDROLYSIS OF MIXTURE OF CELLULOSE AND HEMICELLULOSE MATERIALS (VERSIONS) AND METHODS FOR USE THEREOF (VERSIONS)

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: described are compositions of an enzyme mixture for hydrolysis of a mixture of cellulose and hemicellulose materials and methods for hydrolysis of said mixtures. Disclosed enzyme mixtures include three compositions, the first of which contains a mixture of whole cellulase T.reesei, supplemented β -glucosidase T. reesei BGLU1, the second composition consists of at least one xylanase selected from xylanase GH10 or GH11, and the third composition consists of at leastone additional hemicellulase which is a combination of β -xylosidase and two or more arabinofuranosidases. Disclosed methods include contacting a mixture of cellulose and hemicellulose materials with said compositions.

EFFECT: present inventions increase conversion of glucan and xylan and can be used in converting biomass into sugar.

12 cl, 10 tbl

ПРИОРИТЕТ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 61/038520, поданной 21 марта 2008, которая включена, таким образом, в качестве ссылки в полном объеме.

5 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящие композиции и способы относятся к ферментным смесям целлюлазы/гемицеллюлазы для улучшения ферментативного гидролиза целлюлозных материалов.

ПРЕДПОСЫЛКИ К СОЗДАНИЮ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Основными компонентами биомассы являются целлюлоза и гемицеллюлоза.

10 Целлюлоза состоит из полимеров β -1,4-связанных остатков глюкозы, которые организованы в фибрillлярные структуры более высокого порядка. Гемицеллюлозы представляют собой гетерополисахариды, которые включают моносахариды, отличные от глюкозы, такие как D-ксилоза, L-арabinоза, D-манноза, D-глюкоза, D-галактоза и 4-O-метил-D-глюкуроновая кислота, связанные вместе не только гликозидными связями, 15 а также сложноэфирными связями. Состав и структура гемицеллюлозы более сложные, чем целлюлозы, и могут варьировать качественно и количественно в различных видах древесных растений, травах и злаковых.

Целлюлоза может превращаться в сахара, такие как глюкоза, и использоваться в качестве источника энергии многочисленными микроорганизмами, в том числе 20 бактериями, дрожжами и грибами в промышленных целях. Целлюлозные материалы также могут превращаться в сахара под действием коммерчески доступных ферментов, и полученные в результате сахара могут быть использованы в качестве исходного сырья для промышленных микроорганизмов для получения таких продуктов, как пласти массы и этанол. Однако существующие в настоящее время целлюлазные продукты 25 в основном лишены способности гидролизовать гемицеллюлозные материалы, которые остаются не израсходованными в составах биомассы и могут препятствовать обработке и устраниению биомассы.

Соответственно сохраняется потребность в разработке эффективных ферментных систем для гидролиза как целлюлозы, так и гемицеллюлозы, в том числе совместном 30 получении или перемешивании оптимизированных наборов ферментов для превращения гемицеллюлозных олигомеров и полимеров в свободную пентозу для ферментирования. Такие оптимизированные ферментные системы требуются для улучшения эффективности и экономических показателей биомассы.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

35 Настоящее изобретение относится к оптимизированным биоконвертирующим ферментным смесям, способам их получения, а также к способам применения оптимизированной биоконвертирующей ферментной смеси для превращения биомассы в сахар. Биоконвертирующая ферментная смесь содержит смесь цельной целлюлазы и одной или нескольких гемицеллюлаз, выбор которых продиктован предполагаемым 40 субстратом биомассы и условиями обработки.

В одном аспекте представлен состав ферментной смеси для гидролиза смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов, содержащий:

(а) первую ферментную композицию, содержащую целлюлазу,
 (б) вторую ферментную композицию, содержащую по меньшей мере одну ксиланазу,
 45 выбранную из ксиланазы GH10 или GH11, и
 (с) третью ферментную композицию, содержащую по меньшей мере одну дополнительную гемицеллюлазу, которая не является ксиланазой GH10 или GH11 или не является ксиланазой GH10 или GH11, как в пункте (б),

где состав ферментной смеси обеспечивает по меньшей мере одно из следующего: (i) ускоренную конверсию глюкана или (ii) ускоренную конверсию ксилана по сравнению с эквивалентным составом ферментной смеси, лишенной по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы.

5 В некоторых вариантах осуществления первая ферментная композиция представляет собой смесь цельной целлюлазы из нитчатых грибов. В некоторых вариантах осуществления первая ферментная композиция представляет собой смесь цельной целлюлазы из нитчатых грибов, дополненную дополнительным количеством β -глюкозидазы.

10 В некоторых вариантах осуществления вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN2 из *Trichoderma reesei*. В некоторых вариантах осуществления вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN3 из *Trichoderma reesei*.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна ксиланаза имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную

15 аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна ксиланаза имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или даже по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна ксиланаза имеет аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная

25 гемицеллюлаза выбрана из группы, состоящей из гемицеллюлазы GH54, гемицеллюлазы GH62, гемицеллюлазы GH27, гемицеллюлазы GH36, гемицеллюлазы GH5, гемицеллюлазы GH74, гемицеллюлазы GH67, гемицеллюлазы GH28, гемицеллюлазы GH11, гемицеллюлазы GH10, гемицеллюлазы GH3 и гемицеллюлазы CE5.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная

30 гемицеллюлаза представляет собой β -ксилозидазу или арабинофуранозидазу. В конкретных вариантах осуществления β -ксилозидаза представляет собой BXL1 из *Trichoderma reesei* и арабинофуранозидаза представляет собой ABF1, ABF2 или ABF3 из *Trichoderma reesei*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой сочетание β -ксилозидазы и арабинофуранозидазы.

35 В некоторых вариантах осуществления первая ферментная композиция представляет собой смесь цельной целлюлазы из нитчатых грибов, дополненную дополнительным количеством β -глюкозидазы, вторая ферментная композиция содержит ксиланазу, и по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой сочетание β -ксилозидазы и арабинофуранозидазы.

40 В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой гемицеллюлазу *Trichoderma reesei*, выбранную из группы, состоящей из α -арабинофуранозидазы I (ABF1), α -арабинофуранозидазы II (ABF2), α -арабинофуранозидазы III (ABF3), α -галактозидазы I (AGL1), α -галактозидазы II (AGL2), α -галактозидазы III (AGL3), ацетилксиланэстеразы I (AXE1), ацетилксиланэстеразы III (AXE3), эндоглюканазы VI (EG6), эндоглюканазы VIII (EG8), α -глюкуронидазы I (GLR1), β -маннаназы (MAN1), полигалактуроназы (PEC2), ксиланазы I (XYN1), ксиланазы II (XYN2), ксиланазы III (XYN3) и β -ксилозидазы (BXL1).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по 10 меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или даже по меньшей мере на 99% идентичную одной из указанных выше аминокислотных последовательностей. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза имеет аминокислотную последовательность, соответствующую одной из указанных выше 15 аминокислотных последовательностей.

В другом аспекте представлен способ гидролиза смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов, предусматривающий контактирование смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов с:

(а) первой ферментной композицией, содержащей целлюлазу,

20 (б) второй ферментной композицией, содержащей по меньшей мере одну ксиланазу, выбранную из ксиланазы GH10 или GH11, и

(с) третьей ферментной композицией, содержащей по меньшей мере одну дополнительную гемицеллюлазу, которая не представляет собой ксиланазу GH10 или GH11 или не представляет собой ксиланазу GH10 или GH11, как в пункте (б),

25 осуществляя, таким образом, гидролиз смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов,

где указанное контактирование в результате приводит по меньшей мере к одному из следующего: (i) ускорению конверсии глюкана или (ii) ускорению конверсии ксилана по сравнению с эквивалентным контактированием в отсутствие по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлозы.

В некоторых вариантах осуществления первая ферментная композиция представляет собой смесь цельной целлюлазы из нитчатых грибов. В некоторых вариантах осуществления первая ферментная композиция представляет собой смесь цельной целлюлазы из нитчатых грибов, дополненную дополнительным количеством β -глюкозидазы.

В некоторых вариантах осуществления вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN2 из *Trichoderma reesei*. В некоторых вариантах осуществления вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN3 из *Trichoderma reesei*.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна ксиланаза имеет

40 аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна ксиланаза имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по 45 меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или даже по меньшей мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна ксиланаза имеет

аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза выбрана из группы, состоящей из гемицеллюлазы GH54, гемицеллюлазы GH62, гемицеллюлазы GH27, гемицеллюлазы GH36, гемицеллюлазы GH5, гемицеллюлазы GH74, гемицеллюлазы GH67, гемицеллюлазы GH28, гемицеллюлазы GH11, гемицеллюлазы GH10, гемицеллюлазы GH3 и гемицеллюлазы CE5.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой β -ксилозидазу или арабинофуранозидазу. В конкретных вариантах осуществления β -ксилозидаза представляет собой BXL1 из 10 *Trichoderma reesei*, и арабинофуранозидаза представляет собой ABF1, ABF2 или ABF3 из *Trichoderma reesei*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой сочетание β -ксилозидазы и арабинофуранозидазы.

В некоторых вариантах осуществления первая ферментная композиция представляет собой смесь цельной целлюлазы из нитчатых грибов, дополненную дополнительным количеством β -глюкозидазы, вторая ферментная композиция содержит ксиланазу, и по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой сочетание β -ксилозидазы и арабинофуранозидазы.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой гемицеллюлазу *Trichoderma reesei*, выбранную из группы, состоящей из α -арабинофуранозидазы I (ABF1), α -арабинофуранозидазы II (ABF2), α -арабинофуранозидазы III (ABF3), α -галактозидазы I (AGL1), α -галактозидазы II (AGL2), α -галактозидазы III (AGL3), ацетилксиланэстеразы I (AXE1), ацетилксиланэстеразы III (AXE3), эндоглюканазы VI (EG6), эндоглюканазы VIII (EG8), 25 α -глюкуронидазы I (GLR1), β -маннаназы (MAN1), полигалактуроназы (PEC2), ксиланазы I (XYN1), ксиланазы II (XYN2), ксиланазы III (XYN3) и β -ксилозидазы (BXL1).

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей 30 из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза имеет аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 35 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или даже по меньшей мере на 99% идентичную одной из указанных выше аминокислотных последовательностей. В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза имеет 40 аминокислотную последовательность, соответствующую одной из указанных выше аминокислотных последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления контактирование смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов с первой ферментной композицией, второй ферментной композицией и третьей ферментной композицией проводят одновременно.

45 В некоторых вариантах осуществления первая ферментная композиция, вторая ферментная композиция и третья ферментная композиция представлены в единой композиции ферментной смеси.

Эти и другие аспекты и варианты осуществления настоящих композиций и способов

будут очевидны из следующего описания.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

I. Определения

Если в настоящей заявке не определено иное, все технические и научные термины,

используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области. Заголовки, представленные в настоящей заявке, не являются ограничениями различных аспектов или варианты осуществления изобретения, описанные под одним заголовком, могут применяться к композициям и способам в целом. Как представленное выше общее описание, так и следующее подробное описание являются иллюстративными и пояснительными и не ограничивают композиции и способы, описанные в настоящей заявке. Применение единственного числа включает множественное число, если особым образом не указано иное, и применение «или» означает «и/или», если не указано иное. Термины «содержат», «содержащий», «содержит», «включают», «включающий» и «включает» не предназначены для ограничения. Все патенты и публикации, в том числе все аминокислотные и нуклеотидные последовательности, описанные в таких патентах и публикациях, на которые имеются ссылки в настоящей заявке, специально включены в качестве ссылки. Следующие термины определены для ясности:

В контексте настоящего изобретения термин «целлюлоза» относится к полисахариду, состоящему из $\beta(1 \rightarrow 4)$ связанных D-глюкозных звеньев, имеющих общую формулу $(C_6H_{10}O_5)_n$. Целлюлоза представляет собой структурный компонент первичной клеточной стенки зеленых растений, многих форм водорослей и оомицетов.

В контексте настоящего изобретения термин "целлюлаза" относится к ферменту, способному гидролизовать полимеры целлюлозы до более коротких олигомеров и/или глюкозы.

В контексте настоящего изобретения термин "композиция/препарат/смесь цельной целлюлазы" или подобный относится как к природным, так и неприродным композициям, которые включают множество целлюлаз, продуцируемых организмом, например нитчатыми грибами. Одним примером композиции цельной целлюлазы является среда, в которой культивируют нитчатые грибы, которая включает секреции целлюлазы, например, одну или несколько целлобиогидролаз, одну или несколько эндоглюканаз и одну или несколько β -глюкозидаз в заранее определенном соотношении.

В контексте настоящего изобретения "гемицеллюлоза" представляет собой полимерный компонент растительных материалов, который содержит сахарные мономеры, отличные от глюкозы, в отличие от целлюлозы, которая содержит только глюкозу. Помимо глюкозы гемицеллюлоза может включать ксилозу, маннозу, галактозу, рамнозу и арабинозу, при этом ксилоза является наиболее распространенным сахарным мономером. Гемицеллюлозы содержат большинство из D-пентозных сахаров и иногда небольшие количества L-сахаров. Сахара в гемицеллюлозе могут быть связаны сложноэфирными связями, а также гликозидными связями. Приводимые в качестве примеров формы гемицеллюлозы включают, но не только, галактан, маннан, ксилан, арабинан, арабиноксилан, глюкоманнан, галактоманнан и подобные.

В контексте настоящего изобретения термин "гемицеллюлаза" относится к ферментам, способным разрушать гемицеллюлозу на составляющие ее сахара или более короткие полимеры, и включает эндо-гидролазы, экзо-гидролазы и различные эстеразы.

В контексте настоящего изобретения термин "ксиланаза" относится к белку или полипептидному домену белка или полипептида, происходящего из микроорганизма,

например гриба, бактерии или из растения или животного, и который обладает способностью катализировать расщепление ксилана в одном или нескольких различных положениях углеводного скелета ксилана, включая разветвленные ксиланы и ксилоолигосахариды. Следует отметить, что ксиланаза является разновидностью 5 гемицеллюлазы.

В контексте настоящего изобретения «субстрат биомассы» представляет собой материал, содержащий как целлюлозу, так и гемицеллюлозу.

В контексте настоящего изобретения «природная» композиция представляет собой композицию, продуцируемую в природе или организмом, который встречается в природе.

10 В контексте настоящего изобретения «вариант» белка отличается от «родительского» белка, из которого он получен с помощью замены, делеции или добавления небольшого количества аминокислотных остатков, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислотных остатков. В некоторых случаях родительский белок представляет собой полипептиды «дикого типа», «нативные» или

15 «природные». Варианты белков могут быть описаны как имеющие определенный процент идентичности последовательностей с родительским белком, например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 81%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 83%, по меньшей мере 84%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей

20 мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, даже по меньшей мере 99%, которая может быть определена с использованием подходящего программного обеспечения, известного в данной области, например, описанного в CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel *et al.*

25 (eds) 1987, Supplement 30, section 7.7.18).

Предпочтительные программы включают Vector NTI Advance™ 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), GCG Pileup program, FASTA (Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:2444-2448), и BLAST (BLAST Manual, Altschul *et al.*, Natl Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., and Altschul *et al.* (1997) *NAR* 25:3389-3402). Другой 30 предпочтительной программой выравнивания является ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, PA), предпочтительно использующая параметры по умолчанию. Другим программным обеспечением, которое находит применение, является программа TFASTA Data Searching Program, доступная в Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI).

35 II. Биоконверсия композиций ферментных смесей и способы их применения

Целлюлоза представляет собой гомополимер ангидроцеллобиозы и, следовательно, линейный β -(1-4)-D-глюкан. Гемицеллюлозы, напротив, включают целый ряд соединений, таких как ксиланы, ксилоглюканы, арабиноксиланы и маннаны, в сложных 40 разветвленных структурах, и со спектром заместителей. Как следствие сложного и гетерогенного состава гемицеллюлоз, в частности арабиноксиланов, ферментативное разрушение растительного материала требует действия совокупности функций как расщепления разветвленной структуры, так и деполимеризации. Дополнительно, для 45 разрушения растительных материалов требуются ферменты, которые действуют на гемицеллюлозы, содержащие как пятиуглеродные сахара (пентозы), такие как ксилоза и арабиноза, так и шестиуглеродные сахара (гексоны), такие как манноза и глюкоза.

Ферментативный гидролиз гемицеллюлозы до ее мономеров требует участия нескольких гемицеллюлазных ферментов с различными функциями. Гемицеллюлазы можно расположить в три основные категории: эндо-ферменты, действие которых

направлено на внутренние связи в полисахариде, экзо-ферменты, которые действуют поступательно с любого редуцирующего или нередуцирующего конца полисахаридной цепи, и добавочные ферменты, ацетилэстеразы и эстеразы, которые гидролизуют лигнингликозидные связи, такие как эстераза кумариновой кислоты и эстераза феруловой 5 кислоты.

Хотя некоторые грибы продают полные целлюлазные системы, которые включают экзо-целлобиогидролазы (или CBH-типа целлюлаз), эндоглюканазы (или EG-типа целлюлаз) и β -глюкозидазы (или BG-типа целлюлаз), известные целлюлазные ферменты и их смеси, обычно имеют ограниченную активность в отношении

10 гемицеллюлозы и ограниченное значение в гидролизе растительных материалов. Биоконвертирующие композиции ферментных смесей по настоящему изобретению и способы основаны, в части, на наблюдении того, что некоторые сочетания целлюлаз и гемицеллюлаз значительно повышают эффективность гидролиза растительных материалов, главным образом, как определено мониторингом конверсии глюкана и 15 ксилана.

Приводимая в качестве примера целлюлазная композиция, используемая для идентификации целлюлазных/гемицеллюлазных композиций, которые усиливают гидролиз глюкана и/или ксилана, представляет собой композиции цельной целлюлазы, продуцируемые нитчатыми грибами (т.е. *Trichoderma reesei*). Композиция включает 20 несколько экзо-целлобиогидролаз и эндоглюканаз и дополнена дополнительной β -глюкозидазой для повышения высвобождения глюкозы. Эта композиция коммерчески доступна как ACCELLERASE 1000TM (Danisco A/S, Genencor Division, Palo Alto, CA).

ACCELLERASE 1000TM содержит экзо-целлобиогидролазы (т.е. примерно 50% (масс./ 25 масс.) CBHI (CEL7A) и примерно 14% CBHII (CEL6A), эндоглюканазы (т.е. примерно 12% EGI (CEL7B) и примерно 10% EGII (CEL5A)) и β -глюкозидазу (т.е. примерно 5% BGLI (CEL3A)). Также может присутствовать небольшое количество XYN2 (т.е. примерно менее 1%). Другие компоненты, которые не идентифицированы, также присутствуют в количествах примерно менее чем 1%.

30 Могут быть использованы другие целлюлазные композиции, в том числе другие смеси цельных целлюлаз и смеси целлюлаз, собранные из многочисленных индивидуально выделенных целлюлаз. Предпочтительные целлюлазные композиции включают по меньшей мере одну любую из экзоцеллобиогидролазы, эндоглюканазы и β -глюкозидазы. В некоторых вариантах осуществления цельную питательную среду, 35 которая содержит многочисленные целлюлазы, получают из организма, такого как *Acremonium*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Scybalidium*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Penicillium*, или *Trichoderma* spp., или видов, полученных из них.

Композиция дополнительно содержит по меньшей мере одну и в некоторых случаях 40 две, три или более гемицеллюлаз. Примеры подходящих дополнительных гемицеллюлаз включают ксиланазы, арабинофуранозидазы, ацетилксиланэстеразы, глюкуронидазы, эндогалактаназы, маннаназы, эндо- или экзо-арабиназы, экзо-галактаназы и их смеси. Примеры подходящих эндо-гемицеллюлаз включают эндо-арабиназу, эндо-арабиногалактаназу, эндо-глюканазу, эндо-маннаназу, эндо-ксиланазу и 45 фераксанэндоксиланазу. Примеры подходящих экзо-гемицеллюлаз включают α -L-арабинозидазу, β -L-арабинозидазу, α -1,2-L-фукозидазу, α -D-галактозидазу, β -D-галактозидазу, β -D-глюкозидазу, β -D-глюкуронидазу, β -D-маннозидазу, β -D-ксилозидазу, экзо-глюкозидазу, экзо-целлобиогидролазу, экзо-маннобиогидролазу, экзо-маннаназу, экзо-ксиланазу, ксилан α -глюкуронидазу и кониферин β -глюкозидазу. Примеры

подходящих эстераз включают ацетилэстеразы (ацетилксиланэстеразу, ацетилгалактанэстеразу, ацетилманнанэстеразу и ацетилксиланэстеразу) и арилэстеразы (Эстеразу кумариновой кислоты и эстеразу феруловой кислоты).

Предпочтительно композиции и способы по настоящему изобретению включают по

5 меньшей мере одну ксиланазу, которая представляет собой конкретный тип гемицеллюлазы, которая расщепляет основные цепи ксилана гемицеллюлазы.

Предпочтительно ксиланаза представляет собой эндо-1,4- β -ксиланазу (Е.С. 3.2.1.8).

Многочисленные ксиланазы из грибных и бактериальных микроорганизмов были идентифицированы и охарактеризованы (смотри, например, патент США № 5437992;

10 Coughlin, M. P. *supra*; Biely, P. *et al.* (1993) *Proceedings of the second TRICEL symposium on Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases*, Espoo 1993; Souminen, P and Reinikainen, T. (eds.), в *Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research* 8:125-135). Три специфичные ксиланазы (XYN1, XYN2 и XYN3) были идентифицированы в *T. reesei* (Tenkanen, *et al.* (1992) *Enzyme Microb. Technol.* 14:566; Torronen, *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:1461; и Xu, *et al.* (1998) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49:718).

15 Четвертая ксиланаза (XYN4), выделенная из *T. reesei*, описана в патентах США № 6555335 и 6768001 на имя Saloheimo *et al.*, под названием *Xylanase from Trichoderma reesei*, способ ее получения и способы применения этого фермента, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

20 Ксиланазы, приводимые в качестве примера для применения в настоящих композициях и способах, представляют собой XYN2 и XYN3. Подходящие варианты XYN2 и XYN3 и подходящие родственные ферменты из других организмов, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по 25 меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или даже по меньшей мере на 99% идентичные аминокислотной последовательности XYN2 или XYN3 (т.е. SEQ ID NO: 1 и 2 соответственно).

25 Помимо целлюлазной композиции и ксиланазы композиции и способы могут включать одну или несколько дополнительных гемицеллюлаз, таких как эндо-гемицеллюлаза и 30 экзо-гемицеллюлаза, и/или эстеразы.

Подходящие эндо-гемицеллюлазы включают, но не только, эндо-1,4- β -маннозидазу (Е.С. 3.2.1.78, также известную как β -манназа и β -маннаназа), которая катализирует случайный эногидролиз 1,4- β -D-маннозных связей в маннанах, галактоманнанах, глюкоманнанах; α -амилазу (Е.С. 3.2.1.1), которая катализирует эногидролиз 1,4- α -D-35 глюкозидных связей в полисахарах, содержащих три или более 1,4- α -связанных D-глюкозных звеньев; ксилан α -1,2-глюкуронозидазу (Е.С. 3.2.1.131, также известную как α -глюкуронидаза), которая катализирует гидролиз α -D-1,2-(4-O-метил)глюкуронозильных связей в основной цепи ксиланов древесины твердых пород; и эндоглюканазу (Е.С. 3.2.1.4), которая катализирует эногидролиз 1,4- β -D-глюкозидных 40 связей в целлюлазе, лихенине и β -D-глюканах злаковых. Были идентифицированы многочисленные подтипы эндоглюканаз и являются подходящими для применения в композициях и способах, например, эндоглюканаза I, эндоглюканаза II, эндоглюканаза III, эндоглюканаза V и эндоглюканаза VI.

Подходящие экзо-гемицеллюлазы включают, но не только, α -арабинофуранозидазу, 45 α -галактозидазу и β -ксилозидазу. α -арабинофуранозидаза, также известная как α -L-арабинофуранозидаза (Е.С. 3.2.1.55), катализирует гидролиз концевых нередуцирующих остатков α -L-арабинофуранозида в α -L-арабинозидах. Может быть использован любой по меньшей мере из трех известных подтипов α

арабинофуранозидазы (т.е. abf1, abf2 и abf3). α -галактозидаза (Е.С. 3.2.1.22) катализирует гидролиз концевых нередуцирующих остатков α -D-галактозы в α -D-галактозидах, включая галактозные олигосахариды и галактоманнаны. Может быть использован любой из трех известных подтипов, т.е. α -галактозидаза I (agl1), α -галактозидаза II (agl2) и α -галактозидаза III (agl3). Глюкоамилаза, также известная как глюкан 1,4- α -глюкозидаза (Е.С. 3.2.1.3), катализирует гидролиз концевых 1,4-связанных остатков α -D-глюкозы последовательно с нередуцирующими концами цепей с высвобождением β -D-глюкозы. β -глюкозидаза (Е.С. 3.2.1.21) катализирует гидролиз концевых нередуцирующих остатков β -D-глюкозы с высвобождением β -D-глюкозы. β -ксилозидаза, также известная как ксилан 1,4- β -ксилозидаза (Е.С. 3.2.1.37), катализирует гидролиз 1,4- β -D-ксиланов, для последовательного удаления остатков D-ксилозы с нередуцирующими концами. Композиции, которые включают смесь цельной целлюлазы наряду с ксиланазой и либо α -арабинофуранозидазой или β -ксилозидазой, были особенно эффективными в конверсии глюкана и/или ксилана.

Подходящие эстеразы включают, но не только, эстеразу феруловой кислоты и ацетилксиланэстеразу. Эстераза феруловой кислоты, также известная как ферулатэстераза (Е.С. 3.1.1.73), катализирует гидролиз 4-гидрокси-3-метоксициннамоильной (ферулоильной) группы от этирифицированного сахара, который обычно представляет собой арабинозу в «природных» субстратах. Известные микробиологические эстеразы феруловой кислоты секретируются в культуральную среду. Любой из трех известных подтипов эстеразы феруловой кислоты (fae1, fae2 и fae3) может быть использован в композициях и способах по настоящему изобретению. Ацетилксиланэстераза I (Е.С. 3.1.1.72) катализирует дезацетилирование ксиланов и ксило-олигосахаридов и также может быть использована в композициях и способах. В патентах США № 5426043 и 5681732 на имя De Graaff *et al.* описываются клонирование и экспрессия ацетилксиланэстераз грибного происхождения. В ЕР 507 369 описывается последовательность ДНК, кодирующая ацетилксиланэстеразу, выделенную из *Aspergillus niger*. В патенте США № 5830734 на имя Christgau *et al.*, под названием *Enzyme with acetyl esterase activity*, описывается выделение целого ряда эстераз для применения в пищевой промышленности.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза выбрана из группы, состоящей из гемицеллюлазы GH54, гемицеллюлазы GH62, гемицеллюлазы GH27, гемицеллюлазы GH36, гемицеллюлазы GH5, гемицеллюлазы GH74, гемицеллюлазы GH67, гемицеллюлазы GH28, гемицеллюлазы GH11, гемицеллюлазы GH10, гемицеллюлазы GH3 и гемицеллюлазы CE5. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза выбрана из группы, состоящей из α -арабинофуранозидазы I (ABF1), α -арабинофуранозидазы II (ABF2), α -арабинофуранозидазы III (ABF3), α -галактозидазы I (AGL1), α -галактозидазы II (AGL2), α -галактозидазы III (AGL3), ацетилксиланэстеразы I (AXE1), ацетилксиланэстеразы III (AXE3), эндоглюканазы VI (EG6), эндоглюканазы VIII (EG8), α -глюкуронидазы I (GLR1), β -маннаназы (MAN1), полигалактуроназы (PEC2), ксиланазы I (XYN1), ксиланазы II (XYN2), ксиланазы III (XYN3) и β -ксилозидазы (BXL1), которые могут быть из нитчатых грибов, таких как *T. reesei*. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна дополнительная гемицеллюлаза имеет аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или даже по меньшей

мере на 99% идентичную аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17.

- 5 Варианты гемицеллюлаз (включая ксиланазы) могут включать замены, вставки или делеции, которые по существу не влияют на функцию или добавляют ферментам предпочтительные особенности. В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции не находятся на консервативных мотивах последовательности, а вместо этого ограничены аминокислотными последовательностями вне консервативных
- 10 мотивов. Приводимые в качестве примеров замены являются консервативными заменами, которые сохраняют заряд, гидрофобность или размер боковых групп относительно родительской аминокислотной последовательности. Примеры консервативных замен представлены в следующей таблице:

Исходный аминокислотный остаток	Код	Приемлемые замены
Аланин	A	D-Ala, Gly, бета-Ala, L-Cys, D-Cys
Аргинин	R	D-Arg, Lys, D-Lys, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Аспарагин	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Аспарагиновая кислота	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Цистеин	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Глутамин	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Глутаминовая кислота	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Глицин	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, b-Ala, Acp
Изолейцин	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лейцин	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Лизин	K	D-Lys, Arg, D-Arg, гомо-Arg, D-гомо-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Метионин	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Фенилаланин	F	D-Phe, Тир, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, транс-3,4, или 5-фенилпролин, цис-3,4, или 5-фенилпролин
Пролин	P	D-Pro, L-I-тиоазолидин-4-карбоновая кислота, D- или L-1-оксазолидин-4-карбоновая кислота
Серин	S	D-Ser, Thr, D-Thr, алло-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Тreonин	T	D-Thr, Ser, D-Ser, алло-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Тирозин	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Валин	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

Очевидно, что природные аминокислоты могут быть введены в полипептид путем изменения кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей этот полипептид, тогда как неприродные аминокислоты обычно получают путем химической модификации экспрессированного полипептида.

Еще добавочные ферменты, такие как лакказа (Е.С. 1.10.3.2), которые катализируют окисление ароматических соединений, и последующее восстановление кислорода до воды, также могут быть включены в биоконвертирующие композиции ферментных смесей по настоящему изобретению и способы.

В некоторых вариантах осуществления ферменты для использования в биоконвертирующих ферментных смесях по настоящему изобретению могут быть получены из одного или нескольких штаммов нитчатых грибов. Подходящие нитчатые грибы включают представителей отдела Eumycota и Oomycota, в том числе, но не только, следующие роды: *Aspergillus*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Beauveria*, *Cephalosporium*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Cryptococcus*, *Cyathus*, *Endothia*, *Endothia mucor*, *Fusarium*, *Gilocladium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Myceliophthora*, *Myrothecium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Phanerochaete*, *Podospora*, *Paecilomyces*, *Pyricularia*,

Rhizomucor, Rhizopus, Schizophyllum, Stagonospora, Talaromyces, Trichoderma, Thermomyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trichophyton и *Trametes*. В некоторых вариантах осуществления нитчатые грибы включают, но не только, следующие: *A. nidulans*, *A. niger*, *A. awomari*, *A. aculeatus*, *A. kawachii* *g.*, NRRL 3112, ATCC 22342 (NRRL 3112), ATCC 44733, ATCC 14331 и штамм UVK 143f, *A. oryzae*, например ATCC 11490, *N. crassa*, *Trichoderma reesei*, например NRRL 15709, ATCC 13631, 56764, 56765, 56466, 56767, и *Trichoderma viride*, например ATCC 32098 и 32086. В предпочтительном выполнении, нитчатым грибом являются виды *Trichoderma*. Особенно предпочтительными видами и штаммом для применения в настоящем изобретении является *T. reesei* RL-P37.

- 10 В конкретном варианте осуществления отдельный сконструированный штамм гиперэкспрессирует ферментные компоненты в желаемом соотношении так, чтобы дополнительная очистка или добавки не требовались. В альтернативном варианте осуществления биоконвертирующая ферментная смесь получена из двух или более природных или сконструированных штаммов нитчатых грибов. Желаемое соотношение 15 ферментных компонентов может достигаться путем изменения относительного количества фермента в конечной смеси. Даже когда используют два или более продуцирующих штаммов, желаемое соотношение компонентов ферментов может достигаться путем добавления очищенного или частично очищенного фермента.

- 10 В конкретных вариантах осуществления гемицеллюлазу получают из *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* или *Aspergillus oryzae*. В другом аспекте цельную питательную среду получают из *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium cultorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, 25 *Fusarium sارcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum* или *Fusarium verticilloides*. В другом аспекте гемицеллюлазный комплекс получают из *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Scyphalidium thermophilum* или *Thielavia terrestris*. В других вариантах осуществления гемицеллюлазу получают из *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, например RL-P37 [Sheir-Neiss *et al.* (1984) *Appl. Microbiol. Biotechnology* 20:46-53; патент США № 4797361; доступные в виде биологически чистой культуры из постоянной коллекции Northern Regional Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Peoria, III., U.S.A. (NRRL 15709); ATCC 13631, 56764, 56466, 56767] или *Trichoderma viride*, например ATCC 32098 и 32086.

- 10 В некоторых вариантах осуществления входящий в состав гемицеллюлазный фермент получают путем экспрессии гена, кодирующего гемицеллюлазный фермент. Например, ксиланаза может быть секретирована во внеклеточное пространство, например, грамположительного организма, такого как *Bacillus* или *Actinomycetes*, или 25 эукариотического организма, такого как *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Saccharomyces*, или *Pichia*. Должно быть понятно, что в некоторых вариантах осуществления один или несколько гемицеллюлазных ферментов могут быть гиперэкспрессированы в рекомбинантном микроорганизме, относительно нативных уровней. Клетка-хозяин может быть генетически модифицирована для снижения экспрессии одного или 45 нескольких белков, которые являются эндогенными для клетки. В одном варианте осуществления клетка может содержать один или несколько нативных генов, в частности генов, которые кодируют секретируемые белки, которые были делетированы или инактивированы. Например, один или несколько генов, кодирующих протеазу

(например, ген, кодирующий аспартилпротеазу; смотри Berka *et al.* (1990) *Gene* 86:153-162 и патент США № 6509171), или гены, кодирующие целлюлазу, могут быть дедетированы или инактивированы. Нуклеиновые кислоты, кодирующие гемицеллюлазу, могут присутствовать в геноме организма или перенесены в плазмиду, которая

5 реплицируется в организме. В тех случаях, когда гемицеллюлаза экспрессируется из генома, ген и регуляторные последовательности, ассоциированные с ними, могут быть встроены в геном путем случайной или гомологичной интеграции. В некоторых случаях, например, когда требуется особенно высокий уровень экспрессии, может быть использована как случайная, так и гомологичная интеграция.

10 Субстрат биомассы для использования в качестве источника целлюлозы и гемицеллюлозы для гидролиза с использованием ферментных композиций и способов по настоящему изобретению может представлять собой, например, травяной материал, сельскохозяйственные остатки, остатки от лесного хозяйства, коммунально-бытовые твердые отходы, макулатуру и древесную массу и остатки бумаги, и подобное. Обычные 15 формы субстрата биомассы включают, но не только, деревья, кустарники и травы, пшеницу, солому от пшеницы, жмых сахарного тростника, кукурузу, листовые обертки початка кукурузы, сердцевину кукурузы, в том числе волокна из сердцевин, продукты и побочные продукты перемола зерна, такого как кукуруза (в том числе влажного перемола и сухого перемола), а также коммунально-бытовые твердые отходы,

20 макулатуру и дворовый мусор. Субстрат биомассы может быть получен из “нетронутой биомассы” (такой как деревья, кустарник, травы, плоды, цветы, зеленые культуры, древесина твердых и мягких пород), “использованной биомассы” (такой как побочные продукты сельского хозяйства, промышленные органические отходы, строительный и городской мусор, коммунально-бытовые твердые отходы и дворовый мусор) или 25 “смешанной биомассы”, которая представляет собой смесь нетронутой и использованной биомассы. Субстрат биомассы может включать, например, древесину, древесную массу, отходы бумажного производства, отходы бумажной массы, прессованную древесину, кукурузную солому, кукурузное волокно, отходы от обработки риса, бумаги и древесной массы, древовидные или травянистые растения, плодовую мякоть, овощную мякоть, 30 пемзу, спиртовое зерновое сырье, травы, рисовую шелуху, выжимки сахарного тростника, хлопок, джут, пеньку, лен, бамбук, лубяное волокно, манильскую пеньку, солому, сердцевины кукурузных початков, спиртовое зерновое сырье, листья, пшеничную солому, волокна кокоса, водоросли, просо прутьевидное и их смеси.

Субстрат биомассы может быть использован непосредственно или может

35 подвергаться предварительной обработке с использованием общепринятых способов, известных в данной области. Такие предварительные обработки включают химические, физические и биологические предварительные обработки. Например, технологии предварительных физических обработок включают, без ограничения, различные типы измельчения, разрушения, обработки водяным паром/паровым взрывом, излучением 40 и гидротермолизом. Технологии химической предварительной обработки включают, без ограничения, разбавленную кислоту, щелочные агенты, органические растворители, аммиак, диоксид серы и pH-контролируемый гидротермолизис. Методики биологической предварительной обработки включают, без ограничения, применение лигнин-солябилизирующих микроорганизмов.

45 Оптимальные уровни доз биоконвертирующей ферментной смеси и целлюлаз и гемицеллюлаз в ней, варьируют в зависимости от субстрата биомассы и используемых технологий предварительной обработки. Условия технологического процесса, такие как pH, температура и время реакции также могут влиять на скорости продукции

этанола. Предпочтительно реакционноспособная композиция содержит от 0,1 до 200 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм биомассы, более предпочтительно от 1 до 100 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм биомассы и наиболее предпочтительно 10-50 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм биомассы.

- 5 Примерами количеств являются 0,1-50, 1-40, 20-40, 1-30, 2-40 и 10-20 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм биомассы. Альтернативно, количество фермента может быть определено исходя из количества субстрата в системе. В таком случае реакционноспособная композиция предпочтительно содержит от 0,1 до 50 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм суммарных сахариев, более 10 предпочтительно от 1 до 30 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм суммарных сахариев и более предпочтительно от 10 до 20 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм суммарных сахариев. Альтернативно, количество фермента может быть определено исходя из количества целлюлозного субстрата в системе. В 15 таком случае реакционноспособная композиция предпочтительно содержит от 0,2 до 100 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм суммарных глюканов, более предпочтительно от 2 до 60 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм суммарных глюканов и более предпочтительно от 20 до 40 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм суммарных глюканов. Аналогично количество используемой биоконвертирующей ферментной смеси может быть определено по количеству 20 гемицеллюлозы в биомассе субстрата. Соответственно реакционноспособная композиция предпочтительно содержит от 0,2 до 100 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм гемицеллюлозы, более предпочтительно от 2 до 60 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм гемицеллюлозы и более предпочтительно от 20 до 40 мг биоконвертирующей ферментной смеси на грамм гемицеллюлозы.
- 25 В некоторых вариантах осуществления композиция по настоящему изобретению находится в форме композиции цельной целлюлазы, усиленной гемицеллюлазой, содержащей препарат цельной целлюлазы и по меньшей мере одну гемицеллюлазу, где количество гемицеллюлазы находится в интервале от 1% до 50% от общего белка, и цельная целлюлаза находится в интервале менее чем от 99% до 50% от общего белка.
- 30 Например, гемицеллюлаза может представлять 1% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 99% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 2% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 98% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 3% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 97% от общего белка,
- 35 гемицеллюлаза может представлять 4% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 96% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 5% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 95% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 6% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 94% от общего белка,
- 40 гемицеллюлаза может представлять 7% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 93% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 8% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 92% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 9% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 91% от общего белка,
- 45 гемицеллюлаза может представлять 10% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 90% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 11% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 89% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 12% от общего

белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 88% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 13% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 87% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 14% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может

представлять 41% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 59% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 42% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 58% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 43% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 57% от общего белка, гемицеллюлаза может

представлять 44% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 56% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 45% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 55% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 46% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 54% от общего белка, гемицеллюлаза может

представлять 47% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 53% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 48% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 52% от общего белка, гемицеллюлаза может представлять 49% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 51% от общего белка, или гемицеллюлаза может

представлять 50% от общего белка, и композиция цельной целлюлазы может представлять 50% от общего белка.

При применении композиции биоконвертирующей ферментной смеси могут быть добавлены в подходящий субстратный материал индивидуально, т.е. в виде отдельных

ферментных композиций или в виде одноферментных смесей, в которых находятся все целлюлазы и гемицеллюлазы до добавления к субстрату. В тех случаях, когда целлюлазы и гемицеллюлазы представляют собой отдельные ферментные композиции, они могут быть добавлены к субстрату последовательно или одновременно. В тех случаях, когда целлюлазы и гемицеллюлазы находятся в одной смеси, их добавляют одновременно.

Другие аспекты и варианты осуществления композиций и способов могут быть еще понятнее с учетом следующих примеров, которые не следует истолковывать как ограничивающие. Специалистам в данной области будет очевидно, что многие модификации как материалов, так и способов, могут быть сделаны без отклонения от представленных сведений.

ПРИМЕРЫ

ACCELLERASE 1000TM (Danisco A/S, Genencor Division, Palo Alto, CA), полную жидкую питательную среду нейтрализованного клеточного материала, которая содержит смесь цельной целлюлазы *T. reesei*, дополненную β -глюкозидазой *T. reesei*BGLU1, использовали в качестве источника целлюлаз. MULTIFECT[®] Xylanase (Danisco A/S, Genencor Division, Palo Alto, CA), ксиланазу II, с высоким рI, составленный продукт, использовали в качестве источника XYN2.

Гемицеллюлазы *T. reesei* индивидуально гиперэкспрессировали в штамме *T. reesei*, в котором были делетированы гены, кодирующие CBHI, CBHII, EG1 и EG2, во избежание присутствия этих целлюлаз в полученном в результате клеточном материале (например, кондиционированной среде или “жидких питательных средах”). Гемицеллюлазы, представляющие интерес, находятся в диапазоне от <10% до 85% общего белка в этих жидкых питательных средах. Во многих случаях жидкие среды использовали непосредственно; однако некоторые гемицеллюлазы дополнительно очищали для того, чтобы показать, что наблюдаемые активности не являлись результатом действия других белков, находящихся в жидкой питательной среде.

Аббревиатуры, SEQ ID NO полипептидов, и семейство Carbohydrate-Active enZymes (CAZY) и обозначения рода (где известны) конкретных ферментов приведены в таблице 1. Приведенный выше полипептид XYN2 имеет аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 1 и представляет собой семейство ферментов GH11 Clan C. Аминокислотные последовательности незрелых полипептидов также показаны ниже.

ТАБЛИЦА 1

Аббревиатура	Фермент	SEQ ID	Семейство	Clan
5 ABF1	α-арабинофуранозидаза I	3	GH54	
ABF2	α-арабинофуранозидаза II	4	GH62	F
ABF3	α-арабинофуранозидаза III	5	GH54	
AGL1	α-галактозидаза I	6	GH27	D
AGL2	α-галактозидаза II	7	GH36	D
10 AGL3	α-галактозидаза III	8	GH27	D
AXE1	ацетилксиланэстераза I	9	CE5	
AXE3	ацетилксиланэстераза III	10	CE5	
EG6	эндоглюканаза VI	11	GH74	
EG8	эндоглюканаза VIII	12	GH5	A
GLR1	α-глюкуронидаза I	13	GH67	
15 MAN1	β-маннаназа	14	GH5	A
PEC2	полигалактуроназа	15	GH28	N
XYN1	ксиланаза I	16	GH11	C
XYN3	ксиланаза III	2	GH10	A
BXL1	β-ксилозидаза	17	GH3	

XYN2 (SEQ ID NO: 1)

20 MVSFTSLLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKRQTIQPGTGYNNNGYFYSYWNDGHGG
VTYTNGPGQFQSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNKVINFSGSYNPNGNSYLSVYGWSR
NPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVR
RNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTM DYQIVAVEGYFSSGSASITVS

XYN3 (SEQ ID NO: 2)

25 MKANVILCLLAPLVAALPTETIHLDPELAALRANLERTADLWDRQASQSIDQLIKRK
GKLYFGTATDRGLLQREKNAIIQADLGQVTPENSMKWQSLENNQGQLNWGDADYLV
NFAQQNGKSIRGHTLIWHSQPAWVNNINNADTLRQVIRTHVSTVVGRYKGKIRAWDV
VNEIFNEDGTLRSSVFSRLLGEEFVSI AFR AARDADPSARLYINDYNLDRANYGKVNGL
KTYVSKWISQGV PIDGIGSQSHLSGGGGSGTLGALQQLATVPVTELAITELDIQGAPTTD

30 YTQVVQACLSVSKC VGITVWG ISDKDSWRASTNPLLFDANFNPKPAYNSIVGILQ

ABF1 (SEQ ID NO: 3)

MLS NARIIAAGCIAAGSLVAAGPCDIYSSGGTPCVAAHSTTRALFSAYTGPLYQVKRG
SDGATTAISPLSSGVANAAAQDAFCAGTTCLITIIYDQSGRGNHLTQAPPGGFSGPESNG
YDNLASAIGAPVTLNGQKAYGVFVSPGTGYRNNAASGTAKGDAAEEMYAVLDGTHY
35 NGACCFDYGNAETNSRDTGNHMEAIYFGDSTVWGTGSGKGPWIMADLENGLFGSS
PGNNAGDPSISYRFVTAI KGQPNQWAIRGGNAASGSLSTFYSGARPQVSGYNPMSKEG
AIILGIGG DNSNGAQGTFYEGVMTSGYPSDATEN SVQANIV AARYAVAPLTSGPALT
SSISLRATTACCTTRYIAHSGSTVNTQVVSSSSATALKQQASWTVRAGL ANNACFSFESR
DTSGSYIRHSNFG LVLNANDGSKLFAEDATFCTQAGINGQGSSIRSWSYPTRYFRHYNN

40 TLYIASNGGVHVFDATAAFNDDVSFVVSGGFA

ABF2 (SEQ ID NO: 4)

MELKALSAVVLSFVTLVAAAPATCTLPSTYRWNSTGALASPKSGWVSLKDFSHVIYN
GQHLVWGSTHDTGTIWGSMNFGFLFSDWSNMATASQNKMTPGTVAPTVFYFAPKNIWV
LAYQWGPTTFSYLTSSNPSSVNGWSSPQPLFSGSISGSSPLDQTVIGDSTNMYLFFAGDD
45 GKIYRASMPIGNFPGSFGSTSTVVLSDERNLFEAVQVYTVSGQKQYLMIVEAIGANGR
YFRSFTATNLGGTWT PQA TSESQPFAGKANSGATWTNDISHGDLIRSNPDQMTIDPCN
LQFLYQGRATNSGGDYGLLPYRPGLLTLQR

ABF3 (SEQ ID NO: 5)

MSPRTDRRRSGLLALGLVAASPLATAGPCDIYASGGTPCVAAHSTTRALYGAYSGPL
 YQVSRGSDGATTNIATLSAGGVANAAAQDSFCAGTTCLITVIYDQSGRGNHLTQAPPGG
 AASGPQPNGYDNLASAIGAPVRLNGQKAYGVFIAPFTGYRNNQPNGTATGDQPQGMY
 AIFDGTHYNTGCCFDYGINAETNSLDTGNGHMEAIIYFGTGDGSGRGTGSGGPWIMADL
 5 ENGLFSGYDPINNPADPTINFRFVTAVVKGEPGQWAIRGGDATSGTLSTFYSGQRPANG
 YNPMMSKEGAIILGIGGDNSNRAQGTFYEGVMTSGYPSDSTENAVQANLVAAKYVYDTS
 LMTSGPALSVGSSISLRATTSCCTNRYIAHTGATVNTQVVSSSSSTALKQQASWTVRTG
 LGNSACFSFESRDSPGSFIRHSNYQLMVNANDNSKLFHEDATFCPQAGLNGQGNSFRSW
 SYPTRYWRHFNSLGYIAANGGEHDFDTTLFNDDSVSVSAGFA

10 AGL1 (SEQ ID NO: 6)

MTPHSIDRAARPSVWSGLALLSTAHAIAVMPDGVTKVPSLGWNSWNAYHCDIDES
 KFLSAAEVIVSSGLLDAGYNYVNIDDCWSMKDGRVDGHIAVNTTRFPDGIDGLAKKVH
 DLGLKLGIIYSTAGTATCAGYPASLGYEDVDAADFADWGVSYLKYDNCNVPSDWQDE
 YVACAPDAVQTGPNGTCSTALEPNLAPPGYDWSTSksaerfnamrnalaKQSREIVLS
 15 LCIWGVADVFSWGNETGISWRMSGDISPEWGSVTHIINMNSFKMNSVGFHNDADIL
 EVGNGNLTAATRTHFALWAAMKSPLLIGTDLAQLSQENIELLKKNKHLLAFNQDSVY
 QPATPYKVGVNPDWTFNYTNPAEYWAGPSSKGHLVLMNTLDHTVRKEAKWSEIPG
 LSAGRYEVRDVWTDKSLGCLSSYKTAVAAHDTAVILVGKKCRNW

AGL2 (SEQ ID NO: 7)

20 MLGAPSPRRLADVLAVTAGLVASVRAASPIVSGKSFALNGDNVSYRFHVDDDSKD
 LIGDHFGGPATEDGVFPPIIGPIQGWVDLIGRQRREFPDLGRGDFRTPAVHIRQAAGYTV
 SDFQYKSHRVVEGKPALRGLPSTFGDAGDVSTLVHMYDNYSSVAADLTYSIFPKYDA
 IVRSVNITNMGKGNITIEKLASLSDLPYEDFDMLELKGDWAREGKRLRRKVDYGSQG
 FGSTTGYSYSHLHNPPFSLITPTTTEQGEAWGFSLVYTGSFSVEVEKGSQGLTRAIGVN
 25 PYQLSWPLGPGETFSSPEAVAVFSTTGVGGMSRKFHNLRYRKHLIKSKFATQMHPVLLNS
 WEGLGFYNDTTLHQAQESADLGKLFVLDLGWFGVKHPRVSDNAGLGDWEANPKR
 FPQGLPDFISDVTKLVANSSDHILQFGLWFEPEMVNPNSTLYMEHPDWAIHAGSYPR
 TRNQLVLNVALPEVQDFIIESLSNLSNASISYVKWDNNRGIHEAPYPLDYAYMLGLY
 VFDTLSSKFPNVRWEGCASGGRFDPGVLYFPHIWTSDDTDAVERIAIQFGTSLVYPPS
 30 AMGAHVSAPNGQTQRTTSIAFRAHVAMMGGSGFELTPAEMPEDDKAQIPGIIALAEK
 VNPIVVKGDMWRLSLPEESNWPAAFLISQDGSQLFYFQIRANINNAWPVRLQGLD
 ASA KYKIDGNQTFSGATLMNIGLQYQFNGDYDSKVVFLEKQT

AGL3 (SEQ ID NO: 8)

MSPSAAVLIPLAAVLLRPVVGQTQCGGNLYTPGTLNFTLECYNAFQDCVAQFEAN
 35 ASQVDCNDGKGNLFMQQQANLGASPGSQNNDAIIAFQDIRDLCLLSGSTATWGYS
 QWYWAAAEDACYTNDPTRTDVVKTHPAPFCIQNRDSSLPECYPQPDATPPGGPLKVIK
 TAKTRNGFKSSARGWNTYGVQALVNGSQVPSFAGQSGLFYTQKFVETQCGVLARPEF
 KKAGYDLCSDLGQWQATTAVDQHGRIIYNTTRFLPELASWLHKRDLKLGVIITPGVP
 CLAHNQTILGTNIKIKDVLNGNNNDQINCDFDFRKDGVQQWHDSVAQWASGV
 40 KLDFTPGSPSNGANLACDSSDAWRAYQKAIIKSGRKIRLDISWKLCRNETWLPI
 AESMRTDQDLDNYGTNTLMAWQVGQRAIENYRQYIGLQAQRNVPLTIYPDMDALFTV
 NPEHLAGVNDTIRYTVQNHWLGAGANLIIGGDMEQVDALGLKLTSKQSIDAADFFAK
 YPMQPRNPGTGSNAAKQLQAWIGGSPDDHEAVLIVNYGPDLNGNGFSTKLYGKQKV
 TVSLKDLGISGSAWTFTDIWSGKSSRVTGSYSAWLTEGESQLRLKRTH

45 AXE1 (SEQ ID NO: 9)

MPSVKETLTLLLSQAFLATGSPVDGETVVKRQCPAIHVGARETTVSQGYGSSATVV
 NLVIQAHPGTTSEAIVYPACGGQASC GGISYANSVVNGTAAAAA
 INNFHNSCPDTQLV
 LVGYSQGAQIFDNALCGGGDPGEGITNTAVPLTAGAVSAVKA
 AAI FMGDPRNIHGLPYN

VGTCCTQGFDARPAGFVCPASKIKSYCDAADPYCCTGNDPNVHQGYGQEYQQALA
FINSQLSSGGSQPPGGPTSTSRPTSTRGSSPGPTQTHWGQCGGQGWTGPTQCESGTT
QVISQWYSQCL

AXE3 (SEQ ID NO: 10)

5 MPSIKSTVTFLSQALLATATPMDELEKRQCPGIHFGARETTAPPGYGSATVVNLIN
AHPGTTAEAINYPACGGQAQCGGISYANSVAVGINAVVQAVTNFHNCPTKLVGY
SQGGQIMDDALCGGGDPAEGYPNTAVPLPAAVSAIRAAIFMGDPRYVHGLAYNVGSC
QAQGFAPRNVGFVCPSGNKIKSYCDASDPYCCNGNNANTHQGYGQEYQQALAFVNS
LLG

10 EG6 (SEQ ID NO: 11)

MKVSRVLALVLGAVIPAHAAFSWKNVKLGGGGFVPGIIFHPKTKGVAYARTDIGG
LYRLNADD SWTAVTDGIADNAGWHNWGIDAVALDPQDDQKVYAAVGMYTNWDPS
NGAIIRSSDRGATWSFTNLPFKVGGNMPGRGAGERLAVDPANSNIIYFGARSGNGLWKS
TDGGVTFSKVSSFTATGTYIPDPSDSNGYNSDKQGLMWVTFDSTSSTGGATSRIFVGT

15 ADNITASVYVSTNAGSTWSAVPGQPGKYFPHKAKLQPAEKALYLTYSDGTGPYDGLTG
SVWRYDIAGGTWKDITPVSGSDLYFGFGLGLDLQKPGTLVVASLNSWWPDAQLFRST
DSGTTWSPIWAWASYPTETYYYISTPKAPWIKNFIDVTSESPSDGLIKRLGWMIESLEI
DPTDSNHWLYGTGMTIFGGHDLTNWDTRHNVIQSLADGIEEFSVQDLASAPGGSELLA
AVGDDNGFTFASRNDLGTSPQTVWATPTWATSTSVDYAGNSVKS VVRVGNTAGTQQV

20 AISSDGGATWSIDYAADTSMNGGTVAYSADGDTILWSTASSGVQRSQFQGSFASVSSL
AGAVIASDKKTNVFYAGSGSTFYVSKDTGSSFRGPKLGSAGTIRDIAAHPTTAGTLYV
STDVGIFRSTDGTTFGQVSTALTNTYQIALGVGSGSNWNLYAFGTGPSGARLYASGDS
GASWTDIQQGSQGFGSIDSTKAVAGSGSTAGQVYVGTNGRGFYAQGTVGGGTGTTSSST
KQSSSSTSSASSSTTLRSSVVSTRASTVTSSRTSSAAGPTGSGVAGHYAQC GGIGWTGP

25 TQCVAPYVCQKQNDYYYQCV

EG8 (SEQ ID NO: 12)

MRATSLAAALAVAGDALAGKIKYLGVAI PGIDFGCDIDGSCPTDTSSVPLLSYKGG
DGAGQMKHFAEDDGLNVFRISATWQFVLNNTVDGKLDELNWGSYNKVVNACLETGA
YCMIDMHNFARYNGGIQGGVSDDIFVDLWVQIAKYYEDNDKII FGLMNEPHLDIEI

30 WAQTCQKVTAIRKAGATSQMILLPGTNFASVETYVSTGSAEALGKITNPDGSTDLLYF
DVHKYLDINNSGSHAECTTDNVDAFNDFAWLRQNKRQAISETGASMEPSCMTAFCA
QNKAISENSDVYIGFVGWGAGSFDTSYILTLPLGKPGNYTDNKL MNECILDQFTLDEK
YRPTPTSISTAAEETATATATSDGDAPSTTKPIFI REETASPTPNAVTKPSPDTSDSSDDDK
DSAASMSAQGLTGTVLFTVAALGYMLVAF

35 GLR1 (SEQ ID NO: 13)

MVIRLLLLLAAIVPVFAESGIDAWLRYARLPSSATRGHLTSFPDRIVVLNASKNGPL
ASASSELHKGKIKGILGLDDVSSRGGKHCSTQKSIVISTLDTYQSACGKLSPKLNKEDG
YWLSTKGGSVQIIGQNERGALYGAFAQYLSYLGQGDFSGKAFASNPSAPVRWSNQWDN
LNAATAAHGSIERGYGGPSIFFENGLIKE DLSRVPLYGRLLASVGLNGIVINNVNADANL
40 LNETNLQGLKRIADLFRPGVNVGISLNFA SPQVLGDLSTFDPLDDSVIKWWTDKTDRI
YQLVPDLAGYLVKANSEGQPGPLTYNRTLAEGANLFAKAVQPHGGIVVRAFVYDQLN
ETDWKADRANAAVDFFKSLDGQFDDNVLVQIKYGPIDFQVREPASPLFANLPKTAVSIE
LEVTQEYLGQQSHLVYLPLWQTVLGFD MRYNNRQSYVRDIISGEVFGHKLGGYAGVI
NVGMDDTWLGSHLAMSNMFAYGRLAWNPRADS RDIVEEWT RLTG LDRDV VSTIAD
45 MSLKSWPAYEGYSGNLGIQTLTDILYTHYGANPASQDNNGWGQWTRADSKTIGMDRT
VSNGTGNAGQYPKEVAARFEHTQTPDDLMLWFHHV PYTFRLHSGKSVIQHFYDAHY
TGAATVQRFPAWKSLKS KIDTERYNAVLYKLQYQTGHSLVWRDAITEFYRNLSIPDQ
LNRVRNHPHRIEAEDMDLSGFTVVNVSPTECASKYKAIATNGTATTRLNVPSGKYTV

AVNYYDINGTASYDVLLNGKSLGKWKGDSETHLGHDSTFLDCHSAIRITFEGVRISR
GDKLTIRGTGNAQEQAIDYVSILPQGVVD

MAN1 (SEQ ID NO: 14)

MMMLSKSLLSAATAASALAAVLQPVPRASSFVTISGTQFNIDGKVGYFAGTNCYWC

5 SFLTNHADVDSTFSHISSSGLKVVVWGFNDVNTQPSPGQIWFQKLSATGSTINTGADG
LQTLDYVVQSAEQHNLKLIIPFVNNSDYGGINAYVNAFGGNATTWYTNTAAQTQYR
KYVQAVVSRYANSTAIFAWELGNEPRCNGCSTDVIVQWATSVSQYVKSLSNHLVTLG
DEGLGLSTGDGAYPYTYGEGTDFAKNVQIKSLDFGTFLYDPSWGTNTWGNQWIQT
HAAACLAAGKPCVFEEYGAQQNPCTNEAPWQTTSLTRGMGGDMFWQWGDTFANGA
10 QSNSDPYTVWYNSSNWQCLVKNHDAINGGTTPPPVSSTTSRTSSTPPPGGSCSP
LYGQCGGSGYTGPTCCAQGTCIYSNYWYSQCLNT

PEC2 (SEQ ID NO: 15)

MLKLSLFLGAVTASLCVQAHAVPPPTVTQAPKLEDRAATTCTFSGSNGASSASKSQKS

CATIVLSNVAVPSGVTLDSLNDGTTVIFEGTTWGYKEWSGPLLQIEGNDITIQGASG

15 AVLNPDGARWWDGQGGNGGKTPKFFAAHDLTSSSITNLYIKNTPVQAVSVNGVNGL
TITGMTIDNSAGDSGGHNTDGFIDGSSNVVISGAKVYNQDDCVAVNSGTNITFTGGL
CSGGHGLSIGSVGGRDDNTVQTVTSNSQVTKSANGIRIKATAGKTGTVYTGTLS
SITGYGILIEQNYDGGDLHGSPTSGIPITNLVLQNIISGSNGVSSGNIAIVCGSGACSNW
TWSNVVVTGGKKYGSQCNVPSPATC

20 XYN1 (SEQ ID NO: 16)

MVAFSSLICALTSIASTLAMPTGLEPESSVNTERGMYDFVLGAHNDHRRRASINYD
QNYQTGGQVSYSPSNTGFSVNWNTQDDFVVGVGWTTGSSAPINFGGSFVNSGTGLLS
VYGWSTNPLVEYYIMEDNHNYPAQGTVKGTVTSDGATYTIWENTRVNEPSIQGTATFN
QYISVRNSPRTSGTVTVQNHFNAWASLGLHLGQMNYQVVAEGWGGSGSASQSVSN

25 BXL1 (SEQ ID NO: 17)

MVNNAALLAALSALLPTALAQNNTYANYSAQGQPDLYPETLATLTSFPDCEHGP
LKNNLVCDSSAGYVERAQUALISLFTLEELILNTQNSGPVPRGLPNYQVWNEALHGLD
RANFATKGGQFEWATSFPMPILTTAALNRTLIHQIADIISTQARAFNSNSGRYGLDVYAPN
VNGFRSPLWGRGQETPGEDAFFLSSAYTYEYITGIQGGVDPEHLKVAATVKHFAGYDL

30 ENWNNQSRLGFDIITQQDLSEYYTPQFLAARYAKSRSLMCAYNSVNGVPSCANSFFL
QTLLRESWGFPEWGYVSSDCAVYNVNPHDYASNQSSAAASSLRAGTDIDCGQTYPW
HLNESFVAGEVSRGEIERSVTRLYANLVRGYFDKKNQYRSLGWKDVVKTDAWNISYE
AAVEGIVLLKNDGTLPLSKKVRSLIALIGPWANATTQMCGNYYGPAPYLISPLEAAKKAG
YHVNFEGLTEIAGNSTGFAKAIAAAKKSDAIYLGGIDNTIEQEGADRTDIAWPGNQLD

35 LIKQLSEVGKPLVVLQMGGQVDSSLKSNKKVNSLVWGGPGQSGGVALFDILSGKR
APAGRLVTTQYPAEYVHQFPQNDMNLRPDGKSNPGQTYIWYTGKPYEFGSGLFYTTF
KETLASHPKSLKFNTSSILSAPHGYTYSEQIPVFTFEANIKNSGKTESPYTAMLFVRTSN
AGPAPYPNKWLVGFDRALIKPGHSSKLSIPIPVSALARVDHGNRIVYPGKYELALNTD
ESVKLEFELVGEETIENWPLEEQQIKDATPDA

40 Секретируемые белковые жидкие питательные среды, экспрессирующие ABF1, ABF2,
ABF3, AGL1, AGL2, AGL3, AXE1, AXE3, EG6, EG8, GLR1, MAN1, PEC2, XYN1, XYN3 и
BXL1, тестировали в трехкомпонентных смесях. 150 мкл AFEX-предварительно
обработанной кукурузной соломы (31,7% глюкана, 19,1% ксилана, 1,83% галактана и
3,4% арабинана, исходя из сухой массы, полученной в виде либо 15,6, либо 12% взвеси
45 сухих веществ в pH 5 50 мМ ацетат-натриевом буфере) добавляли в каждую лунку 96-
луночного микротитровального планшета (все экспериментальные точки основаны
на лунках в трех повторах). В одном эксперименте (показан в таблице 9) использована
разбавленная предварительно обработанная аммиаком сердцевина кукурузного початка

при 13,84% твердых веществ в качестве субстрата. К выбранным лункам добавляли только ACCELLERASE 1000TM (CEL) при 20 мг/г целлюлозы, ACCELLERASE 1000TM при 20 мг/г + 5 мг/г MULTIFECT[®] Xylanase, или ACCELLERASE 1000TM при 20 мг/г + 5 мг/г MULTIFECT[®] Xylanase + 1 или 5 мг/г отдельных гемицеллюлазных бульонов все в 20 мкл общего объема фермента.

Дозы фермента приводили в соответствие с суммарной целлюлозой в каждой взвеси субстрата (15,6% или 12% сухого вещества). Планшеты герметично закрывали и инкубировали со встряхиванием при 50°C в течение 72 часов. Реакции затем гасили с использованием 100 мкл 100 мМ глицина, pH 10. Эту смесь фильтровали и разбавляли дополнительно 6× (20 мкл + 100 мкл дистиллированной H₂O) и анализировали на содержание сахара на колонке HPLC-Aminex HPX-87P на приборе Agilent Chem Station HPLC. Области пиков HPLC преобразовывали в концентрации сахара на основе стандартной кривой целлобиозы для целлобиозы и глюкозы или ксилозной стандартной кривой для ксилозы. Процентное преобразование на основе исходного содержания целлюлозы вычисляли для включения H₂O гидролиза для каждого из трех сахарных полимеров. Также вычисляли стандартные отклонения трех повторов.

В таблице 2 и 3 представлены средние значения конверсии (± стандартное отклонение) глюканов и ксиланов для каждой ферментной смеси, как определено в двух отдельных выполнениях протокола. Эти отдельные серии проводили с двумя различными субстратными взвесями AFEX 15,6% (таблица 2) и 12% сухих веществ (таблица 3), и таким образом, содержат различные общие мг целлюлозы, хотя доза в виде мг/г целлюлозы является той же.

ТАБЛИЦА 2			
Фермент		% конверсии глюкана (± SD)	% конверсии ксилана (± SD)
20 мг/г CEL		56,31 (0,88)	39,47 (0,66)
25 мг/г CEL		61,12 (0,99)	41,82 (1,6)
30 мг/г CEL		66,48 (1,9)	46,69 (0,98)
20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN2	---	67,92 (1,1)	61,02 (1,3)
	+ 5 мг/г ABF1	68,84 (2,1)	62,31 (0,67)
	+ 5 мг/г ABF2	74,84 (2,4)	62,36 (1,2)
	+ 5 мг/г ABF3	72,96 (1,4)	63,35 (3,7)
	+ 5 мг/г AXE1	71,93 (1,4)	64,78 (0,83)
	+ 5 мг/г BXL1	78,45 (2,8)	79,29 (4,9)
	+ 5 мг/г EG6	70,15 (2,1)	58,82 (2,7)
	+ 5 мг/г GLR1	67,81 (1,8)	65,70 (2,9)
	+ 5 мг/г MAN1	74,58 (0,80)	66,84 (0,64)
	+ 5 мг/г PEC2	72,94 (4,3)	61,99 (5,5)
20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN3	+ 5 мг/г XYN1	67,33 (1,1)	62,22 (0,44)
	+ 5 мг/г XYN3	78,82 (0,64)	73,63 (0,50)
	+ 1 мг/г XYN3	77,37 (2,6)	74,44 (2,3)
	+ 1 мг/г BXL1		

ТАБЛИЦА 3			
Фермент		% конверсии глюкана (± SD)	% конверсии ксилана (± SD)
20 мг/г CEL		55,08 (1,8)	35,95 (0,94)
30 мг/г CEL		62,63 (0,96)	40,99 (0,30)
20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN2	---	63,96 (0,58)	55,06 (2,0)
	+ 5 мг/г AGL1	67,52 (1,7)	56,00 (1,2)
	+ 5 мг/г AGL2	69,80 (2,7)	55,02 (1,8)
	+ 5 мг/г AGL3	66,51 (0,12)	55,93 (0,59)
	+ 5 мг/г AXE3	68,32 (1,4)	55,89 (0,67)

+ 5 мг/г EG8	70,68 (3,9)	55,40 (2,7)
--------------	-------------	-------------

Добавление XYN2 было эффективным при увеличении конверсии ксилана. Шесть ферментных смесей с третьим компонентом (т.е., XYN3, AGL2, EG8, BXL1, ABF3 или PEC2) показали дополнительные преимущества относительно конверсии глюкана и/или ксилана по сравнению с целлюлазой с XYN2. Четырехкомпонентная ферментная смесь была выполнена в соответствии с описанной выше процедурой. В таблице 4 приведено среднее значение конверсии (\pm стандартное отклонение) глюканов и ксиланов для каждой ферментной смеси.

ТАБЛИЦА 4

Фермент	% конверсии глюкана (\pm SD)	% конверсии ксилана (\pm SD)
20 мг/г CEL	55,43 (6,5)	42,29 (2,3)
20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN2	71,27 (0,67)	63,96 (1,2)
20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN3	85,07 (3,1)	68,69 (2,6)
20 мг/г CEL + 5 XYN2 + 5 мг/г XYN3	86,82 (1,2)	80,68 (0,33)
20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN2 + 2,5 XYN3	76,57 (0,94) 81,58 (0,76) 78,66 (2,7)	72,70 (0,64) 75,89 (0,73) 72,49 (2,3)
	+ 5 мг/г BXL1 + 5 мг/г EG8 + 5 мг/г PEC2	72,80 (6,7) 74,72 (6,0) 78,18 (2,4)

В другом эксперименте ACCELLERASE 1000TM смешивали с очищенной XYN2 и/или XYN3 и анализировали (таблица 5). Сочетание XYN2 и XYN3 давало более эффективную конверсию глюкана и ксилана.

ТАБЛИЦА 5

Фермент	% конверсии глюкана (\pm SD)	% конверсии ксилана (\pm SD)
10 мг/г CEL	43,97 (1,4)	28,41 (1,0)
	+ 10 мг/г XYN2	56,83 (5,7)
	+ 10 мг/г XYN3	43,53 (1,6)
20 мг/г CEL	60,29 (1,7)	40,02 (0,33)
	+ 5 мг/г XYN2 + 5 мг/г XYN3	61,81 (1,2)
	+ 10 мг/г XYN2 + 10 мг/г XYN3	65,20 (1,4)
30 мг/г CEL	67,05 (0,74)	43,74 (0,14)

В дополнительном примере XYN4, XYN5, FAE1 и новая серия ABF3 с ~50% белка, представляющего интерес (по сравнению с предыдущей серией с <10%), тестировали, как описано выше в смесях, содержащих 20 мг/г ACCELLERASE 1000TM + 5 мг/г MULTIFECT[®] Xylanase XYN2. Результаты представлены в Таблице 6. Добавление XYN4, XYN5 или FAE1 было эффективным в повышении конверсии глюкана и ксилана.

ТАБЛИЦА 6

Фермент	% конверсии глюкана (\pm SD)	% конверсии ксилана (\pm SD)
20 мг/г CEL	57,52 (1,08)	38,37 (0,38)
30 мг/г CEL	66,21 (1,37)	44,15 (0,70)
20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN2	68,44 (0,23)	60,46 (0,48)
	+ 5 мг/г ABF3	67,46 (3,97)
	+ 5 мг/г XYN4	63,47 (0,44)
	+ 5 мг/г XYN5	62,73 (3,37)
	+ 5 мг/г FAE1	67,02 (1,59)

В другом эксперименте ACCELLERASE 1000TM смешивали с очищенной Bx11 и XYN2 и/или XYN3 и анализировали, как описано выше. Результаты показаны в таблице 7.

Некоторые сочетания ферментов были эффективны в повышении конверсии глюкана и/или ксилана.

ТАБЛИЦА 7			
	Фермент	% конверсии глюкана (\pm SD)	% конверсии ксилана (\pm SD)
5	35 мг/г CEL	67,95 (0,67)	40,36 (0,36)
	30 мг/г CEL	66,51 (1,99)	38,63 (0,56)
	20 мг/г CEL	58,03 (3,19)	32,28 (1,41)
	10 мг/г CEL	45,01 (0,59)	23,85 (0,42)
10	10 мг/г CEL + 10 мг/г BXL1	46,89 (4,16)	48,85 (2,94)
	20 CEL + 5 XYN2 + 5 BXL1	69,45 (4,88)	60,15 (1,17)
	20 CEL + 5 XYN3 + 5 BXL1	65,17 (8,37)	65,36 (1,14)
	20 CEL + 5 XYN2 + 5 XYN3 + 5 BXL1	75,13 (1,20)	66,97 (1,07)

В другом примере ABF1, ABF2 и ABF3 (ABF3 серия образцов с <10% белка, представляющего интерес), по одному, в двухкомпонентных и трехкомпонентных сочетаниях добавляли к основе 20 мг/г ACCELLERASE 1000TM + 5 мг/г очищенной XYN3 + 5 мг/г очищенной BXL1. Результаты показаны в таблице 8. Некоторые сочетания ферментов были эффективными в повышении конверсии глюкана и/или ксилана.

ТАБЛИЦА 8			
	Фермент	% конверсии глюкана (\pm SD)	% конверсии ксилана (\pm SD)
20	30 мг/г CEL	67,55 (0,18)	45,05 (6,67)
	45 мг/г CEL	79,39 (4,66)	56,05 (2,31)
	---	73,24 (4,39)	79,88 (4,72)
	+ 5 мг/г ABF1	58,21 (0,55)	86,84 (0,47)
	+ 5 мг/г ABF2	84,39 (1,01)	87,15 (1,32)
25	+ 5 мг/г ABF3	65,07 (3,68)	73,46 (4,13)
	20 мг/г CEL + 5 мг/г XYN3 + 5 мг/г BXL1	87,65 (3,11)	87,08 (2,31)
	+ 5 мг/г ABF1 + 5 мг/г ABF2	67,62 (5,01)	87,77 (2,91)
	+ 5 мг/г ABF3	91,21 (1,82)	89,98 (1,08)
30	+ 5 мг/г ABF1 + 5 мг/г ABF2 + 5 мг/г ABF3	99,67 (3,45)	96,73 (4,74)

В другом примере 3,4 мг/г ксилана очищенной ABF1, ABF2 и/или ABF3 добавляли к 20,7 мг/г глюкана ACCELLERASE 1000TM + 5,1 мг/г ксилана каждой из очищенных XYN3 и BXL1. Результаты показаны в таблице 9. Некоторые сочетания ферментов были эффективны в повышении конверсии глюкана и/или ксилана.

ТАБЛИЦА 9			
	Фермент	% конверсии глюкана (\pm SD)	% конверсии ксилана (\pm SD)
40	30,9 мг/г CEL	66,45 (1,64)	33,84 (0,83)
	41,3 мг/г CEL	67,99 (0,57)	35,95 (0,11)
	---	76,67 (0,30)	63,86 (0,08)
	+3,4 мг/г ABF1	76,37 (1,32)	64,18 (1,77)
	+3,4 мг/г ABF2	77,84 (1,48)	66,59 (2,07)
	+3,4 мг/г ABF3	77,53 (1,94)	66,86 (1,84)
45	20,7 мг/г CEL + 5,1 мг/г XYN3 + 5,1 мг/г BXL1	78,32 (1,56)	67,65 (2,31)
	+ 3,4 мг/г ABF1 + 3,4 мг/г ABF2	77,53 (1,04)	66,89 (0,51)
	+ 3,4 мг/г ABF3	79,92 (0,27)	68,96 (0,03)
	+ 3,4 мг/г ABF1 + 3,4 мг/г ABF2 + 3,4 мг/г ABF3	80,22 (1,98)	68,76 (2,22)

Формула изобретения

1. Композиция ферментной смеси для гидролиза смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов, содержащая:

5 (a) первую ферментную композицию, состоящую из полной питательной среды, которая содержит смесь цельной целлюлазы *T. reesei*, дополненную β -глюкозидазой *T. reesei* BGLU1, где целлюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции ферментной смеси,

10 (b) вторую ферментную композицию, состоящую из по меньшей мере одной ксиланазы, выбранной из ксиланазы GH10 или GH11, и

15 (c) третью ферментную композицию, состоящую из по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы, где одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой сочетание β -ксилозидазы BXL1 из *Trichoderma reesei* и двух или более арабинофуранозидаз, выбранных из ABF1, ABF2 или ABF3 из *Trichoderma reesei*, и гемицеллюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции ферментной смеси, где

композиция ферментной смеси обеспечивает по меньшей мере одно из следующего:

(i) повышенную конверсию глюкана или (ii) повышенную конверсию ксилана по сравнению с эквивалентной композицией ферментной смеси, лишенной по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы.

20 2. Композиция по п.1, где вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN2 из *Trichoderma reesei*.

3. Композиция по п.1, где вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN3 из *Trichoderma reesei*.

25 4. Композиция по п.1 или 2, где по крайней мере одна ксиланаза имеет аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере 90% идентичность аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

5. Композиция ферментной смеси для гидролиза смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов, содержащая:

30 (a) первую ферментную композицию, состоящую из полной питательной среды, которая содержит смесь цельной целлюлазы *T. reesei*, дополненную β -глюкозидазой *T. reesei* BGLU1, где целлюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции ферментной смеси,

35 (b) вторую ферментную композицию, состоящую из по меньшей мере одной ксиланазы, выбранной из ксиланазы GH10 или GH11, и

(c) третью ферментную композицию, состоящую из по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы, где одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой сочетание β -ксилозидазы и двух или более арабинофуранозидаз, и гемицеллюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции ферментной смеси,

40 где β -ксилозидаза имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:17, и

две или более арабинофуранозидазы выбраны из арабинофуранозидазы, которая имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:3, арабинофуранозидазы, которая имеет аминокислотную 45 последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:4, и арабинофуранозидазы, которая имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:5,

где композиция ферментной смеси обеспечивает по меньшей мере одно из

следующего: (i) повышенную конверсию глюкана или (ii) повышенную конверсию ксилана по сравнению с эквивалентной композицией ферментной смеси, лишенной по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы.

6. Способ гидролиза смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов,

5 предусматривающий контактирование смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов с:

(a) первой ферментной композицией, состоящей из полной питательной среды, которая содержит смесь цельной целлюлазы *T. reesei*, дополненную β -глюкозидазой *T. reesei* BGLU1, где целлюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции 10 ферментной смеси,

(b) второй ферментной композицией, состоящей из по меньшей мере одной ксиланазы, выбранной из ксиланазы GH10 или GH11, и

(c) третьей ферментной композицией, состоящей из по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы, где одна дополнительная гемицеллюлаза представляет 15 собой сочетание β -ксилозидазы BXL1 из *Trichoderma reesei* и двух или более арабинофуранозидаз, выбранных из ABF1, ABF2 или ABF3 из *Trichoderma reesei*, и гемицеллюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции ферментной смеси,

где контактирование в результате приводит по меньшей мере к одному из

20 следующего: (i) повышенной конверсии глюкана и (ii) повышенной конверсии ксилана по сравнению с эквивалентным контактированием в отсутствие по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы.

7. Способ по п.6, где вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN2 из *Trichoderma reesei*.

25 8. Способ по п.6, где вторая ферментная композиция содержит ксиланазу XYN3 из *Trichoderma reesei*.

9. Способ по любому из пп.6-7, где по крайней мере одна ксиланаза имеет аминокислотную последовательность, имеющую по крайней мере 90% идентичность аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO:1 или SEQ ID NO:2.

30 10. Способ гидролиза смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов, предусматривающий контактирование смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов с:

(a) первой ферментной композицией, состоящей из полной питательной среды, которая содержит смесь цельной целлюлазы *T. reesei*, дополненную β -глюкозидазой *T. 35 reesei* BGLU1, где целлюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции ферментной смеси,

(b) второй ферментной композицией, состоящей из по меньшей мере одной ксиланазы, выбранной из ксиланазы GH10 или GH11, и

(c) третьей ферментной композицией, состоящей из по меньшей мере одной

40 дополнительной гемицеллюлазы, где одна дополнительная гемицеллюлаза представляет собой сочетание β -ксилозидазы и двух или более арабинофуранозидаз, и гемицеллюлаза составляет от 1% до 50% от общего белка в композиции ферментной смеси,

где β -ксилозидаза имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:17, и

45 две или более арабинофуранозидазы выбраны из арабинофуранозидазы, которая имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:3, арабинофуранозидазы, которая имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:4 и

арабинофуранозидазы, которая имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность SEQ ID NO:5,

где контактирование в результате приводит по меньшей мере к одному из следующего: (i) повышенной конверсии глюкана и (ii) повышенной конверсии ксилана по сравнению с эквивалентным контактированием в отсутствие по меньшей мере одной дополнительной гемицеллюлазы.

11. Способ по любому из пп.6, 7 и 10, в котором контактирование смеси целлюлозных и гемицеллюлозных материалов с первой ферментной композицией, второй ферментной композицией и третьей ферментной композицией проводят одновременно.

12. Способ по любому из пп.6, 7 и 10, в котором первая ферментная композиция, вторая ферментная композиция и третья ферментная композиция представлены в единой композиции ферментной смеси.

15

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> DANISCO US INC., GENENCOR DIVISION
 POWER, Scott D.
 LANTZ, Suzanne
 LARENAS, Edmundo
 CALDWELL, Robert

<120> КОМПОЗИЦИИ, ОБОГАЩЕННЫЕ ГЕМИЦЕЛЛЮЛАЗОЙ, ДЛЯ УСКОРЕНИЯ ГИДРОЛИЗА
 БИОМАССЫ

<130> 31119WO-2

<140> PCT/US09/37853
 <141> 2009-03-20

<150> US 61/038,520
 <151> 2008-03-21

<160> 17

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 222
 <212> БЕЛОК
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> XYN2

<400> 1

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

Ser Cys Arg Pro Ala Ala Glu Val Glu Ser Val Ala Val Glu Lys Arg
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2
 <211> 347
 <212> BELOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> XYN3

<400> 2

Met Lys Ala Asn Val Ile Leu Cys Leu Leu Ala Pro Leu Val Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Glu Thr Ile His Leu Asp Pro Glu Leu Ala Ala Leu Arg
 20 25 30

Ala Asn Leu Thr Glu Arg Thr Ala Asp Leu Trp Asp Arg Gln Ala Ser
 35 40 45

Gln Ser Ile Asp Gln Leu Ile Lys Arg Lys Gly Lys Leu Tyr Phe Gly
 50 55 60

Thr Ala Thr Asp Arg Gly Leu Leu Gln Arg Glu Lys Asn Ala Ala Ile
 65 70 75 80

Ile Gln Ala Asp Leu Gly Gln Val Thr Pro Glu Asn Ser Met Lys Trp
 85 90 95

Gln Ser Leu Glu Asn Asn Gln Gly Gln Leu Asn Trp Gly Asp Ala Asp
 100 105 110

Tyr Leu Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Lys Ser Ile Arg Gly His
 115 120 125

Thr Leu Ile Trp His Ser Gln Leu Pro Ala Trp Val Asn Asn Ile Asn
 130 135 140

Asn Ala Asp Thr Leu Arg Gln Val Ile Arg Thr His Val Ser Thr Val
 145 150 155 160

Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Arg Ala Trp Asp Val Val Asn Glu
 165 170 175

Ile Phe Asn Glu Asp Gly Thr Leu Arg Ser Ser Val Phe Ser Arg Leu
 180 185 190

Leu Gly Glu Glu Phe Val Ser Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Asp Ala
 195 200 205

Asp Pro Ser Ala Arg Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Asn Leu Asp Arg Ala
 210 215 220

Asn Tyr Gly Lys Val Asn Gly Leu Lys Thr Tyr Val Ser Lys Trp Ile
 225 230 235 240

Ser Gln Gly Val Pro Ile Asp Gly Ile Gly Ser Gln Ser His Leu Ser
 245 250 255

Gly Gly Gly Ser Gly Thr Leu Gly Ala Leu Gln Gln Leu Ala Thr
 260 265 270

Val Pro Val Thr Glu Leu Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Gln Gly Ala
 275 280 285

Pro Thr Thr Asp Tyr Thr Gln Val Val Gln Ala Cys Leu Ser Val Ser
 290 295 300

Lys Cys Val Gly Ile Thr Val Trp Gly Ile Ser Asp Lys Asp Ser Trp
 305 310 315 320

Arg Ala Ser Thr Asn Pro Leu Leu Phe Asp Ala Asn Phe Asn Pro Lys
 325 330 335

Pro Ala Tyr Asn Ser Ile Val Gly Ile Leu Gln
 340 345

<210> 3
 <211> 500
 <212> БЕЛЮК

<213> Trichoderma reesei

<220>

<221> misc_feature
<223> ABF1

<400> 3

Met	Leu	Ser	Asn	Ala	Arg	Ile	Ile	Ala	Ala	Gly	Cys	Ile	Ala	Ala	Gly
1					5			10						15	

Ser	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Pro	Cys	Asp	Ile	Tyr	Ser	Ser	Gly	Gly	Thr
								25					30		

Pro	Cys	Val	Ala	Ala	His	Ser	Thr	Thr	Arg	Ala	Leu	Phe	Ser	Ala	Tyr
							35		40				45		

Thr	Gly	Pro	Leu	Tyr	Gln	Val	Lys	Arg	Gly	Ser	Asp	Gly	Ala	Thr	Thr
						50		55			60				

Ala	Ile	Ser	Pro	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	Ala	Asn	Ala	Ala	Gln	Asp
							65		70		75		80	

Ala	Phe	Cys	Ala	Gly	Thr	Thr	Cys	Leu	Ile	Thr	Ile	Ile	Tyr	Asp	Gln
							85		90				95		

Ser	Gly	Arg	Gly	Asn	His	Leu	Thr	Gln	Ala	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser
						100		105				110		

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

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

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

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

Ala	Cys	Cys	Phe	Asp	Tyr	Gly	Asn	Ala	Glu	Thr	Asn	Ser	Arg	Asp	Thr
							180		185			190			

Gly	Asn	Gly	His	Met	Glu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Gly	Asp	Ser	Thr	Val	Trp
							195		200			205			

Gly	Thr	Gly	Ser	Gly	Lys	Gly	Pro	Trp	Ile	Met	Ala	Asp	Leu	Glu	Asn
							210		215			220			

Gly Leu Phe Ser Gly Ser Ser Pro Gly Asn Asn Ala Gly Asp Pro Ser
 225 230 235 240

Ile Ser Tyr Arg Phe Val Thr Ala Ala Ile Lys Gly Gln Pro Asn Gln
 245 250 255

Trp Ala Ile Arg Gly Gly Asn Ala Ala Ser Gly Ser Leu Ser Thr Phe
 260 265 270

Tyr Ser Gly Ala Arg Pro Gln Val Ser Gly Tyr Asn Pro Met Ser Lys
 275 280 285

Glu Gly Ala Ile Ile Leu Gly Ile Gly Gly Asp Asn Ser Asn Gly Ala
 290 295 300

Gln Gly Thr Phe Tyr Glu Gly Val Met Thr Ser Gly Tyr Pro Ser Asp
 305 310 315 320

Ala Thr Glu Asn Ser Val Gln Ala Asn Ile Val Ala Ala Arg Tyr Ala
 325 330 335

Val Ala Pro Leu Thr Ser Gly Pro Ala Leu Thr Val Gly Ser Ser Ile
 340 345 350

Ser Leu Arg Ala Thr Thr Ala Cys Cys Thr Thr Arg Tyr Ile Ala His
 355 360 365

Ser Gly Ser Thr Val Asn Thr Gln Val Val Ser Ser Ser Ser Ala Thr
 370 375 380

Ala Leu Lys Gln Gln Ala Ser Trp Thr Val Arg Ala Gly Leu Ala Asn
 385 390 395 400

Asn Ala Cys Phe Ser Phe Glu Ser Arg Asp Thr Ser Gly Ser Tyr Ile
 405 410 415

Arg His Ser Asn Phe Gly Leu Val Leu Asn Ala Asn Asp Gly Ser Lys
 420 425 430

Leu Phe Ala Glu Asp Ala Thr Phe Cys Thr Gln Ala Gly Ile Asn Gly
 435 440 445

Gln Gly Ser Ser Ile Arg Ser Trp Ser Tyr Pro Thr Arg Tyr Phe Arg
 450 455 460

His Tyr Asn Asn Thr Leu Tyr Ile Ala Ser Asn Gly Gly Val His Val
 465 470 475 480

Phe Asp Ala Thr Ala Ala Phe Asn Asp Asp Val Ser Phe Val Val Ser
 485 490 495

Gly Gly Phe Ala
 500

<210> 4
 <211> 322
 <212> БЕЛЮК
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ABF2

<400> 4

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

Val Ala Ala Ala Pro Ala Thr Cys Thr Leu Pro Ser Thr Tyr Arg Trp
 20 25 30

Asn Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser Pro Lys Ser Gly Trp Val Ser Leu
 35 40 45

Lys Asp Phe Ser His Val Ile Tyr Asn Gly Gln His Leu Val Trp Gly
 50 55 60

Ser Thr His Asp Thr Gly Thr Ile Trp Gly Ser Met Asn Phe Gly Leu
 65 70 75 80

Phe Ser Asp Trp Ser Asn Met Ala Thr Ala Ser Gln Asn Lys Met Thr
 85 90 95

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

Trp Val Leu Ala Tyr Gln Trp Gly Pro Thr Thr Phe Ser Tyr Leu Thr
 115 120 125

Ser Ser Asn Pro Ser Ser Val Asn Gly Trp Ser Ser Pro Gln Pro Leu
 130 135 140

Phe Ser Gly Ser Ile Ser Gly Ser Ser Pro Leu Asp Gln Thr Val Ile
 145 150 155 160

Gly Asp Ser Thr Asn Met Tyr Leu Phe Phe Ala Gly Asp Asp Gly Lys
 165 170 175

Ile Tyr Arg Ala Ser Met Pro Ile Gly Asn Phe Pro Gly Ser Phe Gly

180

185

190

Ser Thr Ser Thr Val Val Leu Ser Asp Glu Arg Asn Asn Leu Phe Glu
 195 200 205

Ala Val Gln Val Tyr Thr Val Ser Gly Gln Lys Gln Tyr Leu Met Ile
 210 215 220

Val Glu Ala Ile Gly Ala Asn Gly Arg Tyr Phe Arg Ser Phe Thr Ala
 225 230 240

Thr Asn Leu Gly Gly Thr Trp Thr Pro Gln Ala Thr Ser Glu Ser Gln
 245 250 255

Pro Phe Ala Gly Lys Ala Asn Ser Gly Ala Thr Trp Thr Asn Asp Ile
 260 265 270

Ser His Gly Asp Leu Ile Arg Ser Asn Pro Asp Gln Thr Met Thr Ile
 275 280 285

Asp Pro Cys Asn Leu Gln Phe Leu Tyr Gln Gly Arg Ala Thr Asn Ser
 290 295 300

Gly Gly Asp Tyr Gly Leu Leu Pro Tyr Arg Pro Gly Leu Leu Thr Leu
 305 310 315 320

Gln Arg

<210> 5
 <211> 510
 <212> BEJOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> ABF3

<400> 5

Met Ser Pro Arg Thr Asp Arg Arg Arg Ser Gly Leu Leu Ala Leu Gly
 1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Ser Pro Leu Ala Thr Ala Gly Pro Cys Asp Ile Tyr
 20 25 30

Ala Ser Gly Gly Thr Pro Cys Val Ala Ala His Ser Thr Thr Arg Ala
 35 40 45

Leu Tyr Gly Ala Tyr Ser Gly Pro Leu Tyr Gln Val Ser Arg Gly Ser
 50 55 60

Asp Gly Ala Thr Thr Asn Ile Ala Thr Leu Ser Ala Gly Gly Val Ala
 65 70 75 80

Asn Ala Ala Ala Gln Asp Ser Phe Cys Ala Gly Thr Thr Cys Leu Ile
 85 90 95

Thr Val Ile Tyr Asp Gln Ser Gly Arg Gly Asn His Leu Thr Gln Ala
 100 105 110

Pro Pro Gly Gly Ala Ala Ser Gly Pro Gln Pro Asn Gly Tyr Asp Asn
 115 120 125

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

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

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

Asp Gly Thr His Tyr Asn Thr Gly Cys Cys Phe Asp Tyr Gly Asn Ala
 180 185 190

Glu Thr Asn Ser Leu Asp Thr Gly Asn Gly His Met Glu Ala Ile Tyr
 195 200 205

Phe Gly Thr Gly Asp Gly Ser Gly Arg Gly Thr Gly Ser Gly Ser Gly
 210 215 220

Pro Trp Ile Met Ala Asp Leu Glu Asn Gly Leu Phe Ser Gly Tyr Asp
 225 230 235 240

Pro Ile Asn Asn Pro Ala Asp Pro Thr Ile Asn Phe Arg Phe Val Thr
 245 250 255

Ala Val Val Lys Gly Glu Pro Gly Gln Trp Ala Ile Arg Gly Gly Asp
 260 265 270

Ala Thr Ser Gly Thr Leu Ser Thr Phe Tyr Ser Gly Gln Arg Pro Ala
 275 280 285

Asn Gly Tyr Asn Pro Met Ser Lys Glu Gly Ala Ile Ile Leu Gly Ile
 290 295 300

Gly Gly Asp Asn Ser Asn Arg Ala Gln Gly Thr Phe Tyr Glu Gly Val
 305 310 315 320

RU 2536 256 C2

Met Thr Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Thr Glu Asn Ala Val Gln Ala
 325 330 335

Asn Leu Val Ala Ala Lys Tyr Val Tyr Asp Thr Ser Leu Met Thr Ser
 340 345 350

Gly Pro Ala Leu Ser Val Gly Ser Ser Ile Ser Leu Arg Ala Thr Thr
 355 360 365

Ser Cys Cys Thr Asn Arg Tyr Ile Ala His Thr Gly Ala Thr Val Asn
 370 375 380

Thr Gln Val Val Ser Ser Ser Ser Thr Ala Leu Lys Gln Gln Ala
 385 390 395 400

Ser Trp Thr Val Arg Thr Gly Leu Gly Asn Ser Ala Cys Phe Ser Phe
 405 410 415

Glu Ser Arg Asp Ser Pro Gly Ser Phe Ile Arg His Ser Asn Tyr Gln
 420 425 430

Leu Met Val Asn Ala Asn Asp Asn Ser Lys Leu Phe His Glu Asp Ala
 435 440 445

Thr Phe Cys Pro Gln Ala Gly Leu Asn Gly Gln Gly Asn Ser Phe Arg
 450 455 460

Ser Trp Ser Tyr Pro Thr Arg Tyr Trp Arg His Phe Asn Ser Leu Gly
 465 470 475 480

Tyr Ile Ala Ala Asn Gly Gly Glu His Asp Phe Asp Thr Thr Leu
 485 490 495

Phe Asn Asp Asp Val Ser Phe Val Val Ser Ala Gly Phe Ala
 500 505 510

<210> 6
 <211> 444
 <212> БЕЛОК
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> AGL1

<400> 6

Met Thr Pro His Ser Ile Asp Arg Ala Ala Arg Pro Ser Val Trp Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ser Thr Ala His Ala Ile Val Met Pro Asp
20 25 30

Gly Val Thr Gly Lys Val Pro Ser Leu Gly Trp Asn Ser Trp Asn Ala
35 40 45

Tyr His Cys Asp Ile Asp Glu Ser Lys Phe Leu Ser Ala Ala Glu Val
50 55 60

Ile Val Ser Ser Gly Leu Leu Asp Ala Gly Tyr Asn Tyr Val Asn Ile
65 70 75 80

Asp Asp Cys Trp Ser Met Lys Asp Gly Arg Val Asp Gly His Ile Ala
85 90 95

Val Asn Thr Thr Arg Phe Pro Asp Gly Ile Asp Gly Leu Ala Lys Lys
100 105 110

Val His Asp Leu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ser Thr Ala Gly Thr
115 120 125

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

Ala Ala Asp Phe Ala Asp Trp Gly Val Asp Tyr Leu Lys Tyr Asp Asn
145 150 155 160

Cys Asn Val Pro Ser Asp Trp Gln Asp Glu Tyr Val Ala Cys Ala Pro
165 170 175

Asp Ala Val Gln Thr Gly Pro Asn Gly Thr Cys Ser Thr Ala Leu Glu
180 185 190

Pro Asn Leu Ala Pro Pro Gly Tyr Asp Trp Ser Thr Ser Lys Ser Ala
195 200 205

Glu Arg Phe Asn Ala Met Arg Asn Ala Leu Ala Lys Gln Ser Arg Glu
210 215 220

Ile Val Leu Ser Leu Cys Ile Trp Gly Val Ala Asp Val Phe Ser Trp
225 230 235 240

Gly Asn Glu Thr Gly Ile Ser Trp Arg Met Ser Gly Asp Ile Ser Pro
245 250 255

Glu Trp Gly Ser Val Thr His Ile Ile Asn Met Asn Ser Phe Lys Met
260 265 270

Asn Ser Val Gly Phe Trp Gly His Asn Asp Ala Asp Ile Leu Glu Val
 275 280 285

Gly Asn Gly Asn Leu Thr Ala Ala Glu Thr Arg Thr His Phe Ala Leu
 290 295 300

Trp Ala Ala Met Lys Ser Pro Leu Leu Ile Gly Thr Asp Leu Ala Gln
 305 310 315 320

Leu Ser Gln Glu Asn Ile Glu Leu Leu Lys Asn Lys His Leu Leu Ala
 325 330 335

Phe Asn Gln Asp Ser Val Tyr Gly Gln Pro Ala Thr Pro Tyr Lys Trp
 340 345 350

Gly Val Asn Pro Asp Trp Thr Phe Asn Tyr Thr Asn Pro Ala Glu Tyr
 355 360 365

Trp Ala Gly Pro Ser Ser Lys Gly His Leu Val Leu Met Met Asn Thr
 370 375 380

Leu Asp His Thr Val Arg Lys Glu Ala Lys Trp Ser Glu Ile Pro Gly
 385 390 395 400

Leu Ser Ala Gly Arg Tyr Glu Val Arg Asp Val Trp Thr Asp Lys Ser
 405 410 415

Leu Gly Cys Leu Ser Ser Tyr Lys Thr Ala Val Ala Ala His Asp Thr
 420 425 430

Ala Val Ile Leu Val Gly Lys Lys Cys Arg Asn Trp
 435 440

<210> 7
 <211> 746
 <212> BEЛОК
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> AGL2

<400> 7

Met Leu Gly Ala Pro Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asp Val Leu Ala Val
 1 5 10 15

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

RU 2536 256 C2

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

His Val Asp Asp Asp Ser Lys Asp Leu Ile Gly Asp His Phe Gly Gly
50 55 60

Pro Ala Thr Glu Asp Gly Val Phe Pro Pro Ile Ile Gly Pro Ile Gln
65 70 75 80

Gly Trp Val Asp Leu Ile Gly Arg Gln Arg Arg Glu Phe Pro Asp Leu
85 90 95

Gly Arg Gly Asp Phe Arg Thr Pro Ala Val His Ile Arg Gln Ala Ala
100 105 110

Gly Tyr Thr Val Ser Asp Phe Gln Tyr Lys Ser His Arg Val Val Glu
115 120 125

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

Asp Val Ser Thr Leu Val Val His Met Tyr Asp Asn Tyr Ser Ser Val
145 150 155 160

Ala Ala Asp Leu Thr Tyr Ser Ile Phe Pro Lys Tyr Asp Ala Ile Val
165 170 175

Arg Ser Val Asn Ile Thr Asn Met Gly Lys Gly Asn Ile Thr Ile Glu
180 185 190

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

Leu Glu Leu Lys Gly Asp Trp Ala Arg Glu Gly Lys Arg Leu Arg Arg
210 215 220

Lys Val Asp Tyr Gly Ser Gln Gly Phe Gly Ser Thr Thr Gly Tyr Ser
225 230 235 240

Ser His Leu His Asn Pro Phe Phe Ser Leu Ile Thr Pro Thr Thr Thr
245 250 255

Glu Ser Gln Gly Glu Ala Trp Gly Phe Ser Leu Val Tyr Thr Gly Ser
260 265 270

Phe Ser Val Glu Val Glu Lys Gly Ser Gln Gly Leu Thr Arg Ala Ala
275 280 285

Ile Gly Val Asn Pro Tyr Gln Leu Ser Trp Pro Leu Gly Pro Gly Glu
 290 295 300

Thr Phe Ser Ser Pro Glu Ala Val Ala Val Phe Ser Thr Thr Gly Val
 305 310 315 320

Gly Gly Met Ser Arg Lys Phe His Asn Leu Tyr Arg Lys His Leu Ile
 325 330 335

Lys Ser Lys Phe Ala Thr Gln Met His Pro Val Leu Leu Asn Ser Trp
 340 345 350

Glu Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Asn Asp Thr Thr Ile Leu His Leu Ala
 355 360 365

Gln Glu Ser Ala Asp Leu Gly Ile Lys Leu Phe Val Leu Asp Asp Gly
 370 375 380

Trp Phe Gly Val Lys His Pro Arg Val Ser Asp Asn Ala Gly Leu Gly
 385 390 395 400

Asp Trp Glu Ala Asn Pro Lys Arg Phe Pro Gln Gly Leu Pro Asp Phe
 405 410 415

Ile Ser Asp Val Thr Lys Leu Lys Val Ala Asn Ser Ser Asp His Leu
 420 425 430

Gln Phe Gly Leu Trp Phe Glu Pro Glu Met Val Asn Pro Asn Ser Thr
 435 440 445

Leu Tyr Met Glu His Pro Asp Trp Ala Ile His Ala Gly Ser Tyr Pro
 450 455 460

Arg Thr Leu Thr Arg Asn Gln Leu Val Leu Asn Val Ala Leu Pro Glu
 465 470 475 480

Val Gln Asp Phe Ile Ile Glu Ser Leu Ser Asn Ile Leu Ser Asn Ala
 485 490 495

Ser Ile Ser Tyr Val Lys Trp Asp Asn Asn Arg Gly Ile His Glu Ala
 500 505 510

Pro Tyr Pro Gly Leu Asp Tyr Ala Tyr Met Leu Gly Leu Tyr Arg Val
 515 520 525

Phe Asp Thr Leu Ser Ser Lys Phe Pro Asn Val Arg Trp Glu Gly Cys
 530 535 540

Ala Ser Gly Gly Gly Arg Phe Asp Pro Gly Val Leu Gln Tyr Phe Pro
 545 550 555 560

His Ile Trp Thr Ser Asp Asp Thr Asp Ala Val Glu Arg Ile Ala Ile
 565 570 575

Gln Phe Gly Thr Ser Leu Val Tyr Pro Pro Ser Ala Met Gly Ala His
 580 585 590

Val Ser Ala Val Pro Asn Gly Gln Thr Gln Arg Thr Thr Ser Ile Ala
 595 600 605

Phe Arg Ala His Val Ala Met Met Gly Gly Ser Phe Gly Phe Glu Leu
 610 615 620

Thr Pro Ala Glu Met Pro Glu Asp Asp Lys Ala Gln Ile Pro Gly Ile
 625 630 635 640

Ile Ala Leu Ala Glu Lys Val Asn Pro Ile Val Val Lys Gly Asp Met
 645 650 655

Trp Arg Leu Ser Leu Pro Glu Glu Ser Asn Trp Pro Ala Ala Leu Phe
 660 665 670

Ile Ser Gln Asp Gly Ser Gln Ala Val Leu Phe Tyr Phe Gln Ile Arg
 675 680 685

Ala Asn Ile Asn Asn Ala Trp Pro Val Leu Arg Leu Gln Gly Leu Asp
 690 695 700

Ala Ser Ala Lys Tyr Lys Ile Asp Gly Asn Gln Thr Phe Ser Gly Ala
 705 710 715 720

Thr Leu Met Asn Ile Gly Leu Gln Tyr Gln Phe Asn Gly Asp Tyr Asp
 725 730 735

Ser Lys Val Val Phe Leu Glu Lys Gln Thr
 740 745

<210> 8
 <211> 624
 <212> BEJOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> AGL3

<400> 8

Met Ser Pro Ser Ala Ala Val Leu Ile Pro Leu Ala Ala Val Leu

1

5

10

15

Leu Arg Pro Val Val Gly Gln Thr Gln Cys Gly Gly Asn Leu Tyr Thr
 20 25 30

Pro Gly Thr Leu Asn Phe Thr Leu Glu Cys Tyr Asn Ala Phe Gln Asp
 35 40 45

Cys Val Ala Gln Phe Glu Ala Asn Ala Ser Gln Val Asp Cys Asn Asp
 50 55 60

Gly Lys Gly Asn Leu Phe Met Gln Gln Gln Ala Asn Leu Gly Ala Ser
 65 70 75 80

Pro Gly Ser Gln Asn Asn Asp Ala Ile Ile Ala Phe Gln Asp Ile Arg
 85 90 95

Asp Leu Cys Leu Leu Ser Gly Ser Thr Thr Ala Thr Trp Gly Tyr Ser
 100 105 110

Asp Asn Gln Trp Tyr Trp Ala Ala Ala Glu Asp Ala Cys Tyr Thr Asn
 115 120 125

Asp Pro Thr Arg Thr Asp Val Val Lys Thr His Pro Ala Pro Phe Cys
 130 135 140

Ile Gln Asn Arg Asp Ser Ser Leu Pro Glu Cys Tyr Pro Gln Pro Asp
 145 150 155 160

Ala Thr Pro Pro Gly Gly Pro Leu Lys Val Ile Lys Thr Ala Lys Thr
 165 170 175

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

Gln Ala Leu Val Asn Gly Ser Gln Val Val Pro Ser Phe Ala Gly Gln
 195 200 205

Ser Gly Leu Phe Tyr Thr Gln Lys Phe Val Glu Thr Gln Cys Gly Val
 210 215 220

Leu Ala Arg Pro Glu Phe Lys Lys Ala Gly Tyr Asp Leu Cys Ser Leu
 225 230 235 240

Asp Ser Gly Trp Gln Ala Thr Thr Ala Val Asp Gln His Gly Arg Ile
 245 250 255

Ile Tyr Asn Thr Thr Arg Phe Asn Leu Pro Glu Leu Ala Ser Trp Leu

260

265

270

His Lys Arg Asp Leu Lys Leu Gly Val Tyr Ile Thr Pro Gly Val Pro
 275 280 285

Cys Leu Ala His Asn Gln Thr Ile Leu Gly Thr Asn Ile Lys Ile Lys
 290 295 300

Asp Val Leu Asn Gly Asn Asn Asp Gln Ile Asn Cys Asp Phe Asp Phe
 305 310 315 320

Arg Lys Asp Gly Val Gln Gln Trp His Asp Ser Val Val Ala Gln Trp
 325 330 335

Ala Ser Trp Gly Val Asp Met Leu Lys Leu Asp Phe Leu Thr Pro Gly
 340 345 350

Ser Pro Ser Asn Gly Ala Asn Leu Ala Cys Asp Ser Ser Asp Ala Val
 355 360 365

Arg Ala Tyr Gln Lys Ala Ile Lys Lys Ser Gly Arg Lys Ile Arg Leu
 370 375 380

Asp Ile Ser Trp Lys Leu Cys Arg Asn Glu Thr Trp Leu Pro Ile Trp
 385 390 395 400

Ser Asp Leu Ala Glu Ser Met Arg Thr Asp Gln Asp Leu Asp Asn Tyr
 405 410 415

Gly Thr Asn Thr Leu Met Ala Trp Gln Val Gly Gln Arg Ala Ile Glu
 420 425 430

Asn Tyr Arg Gln Tyr Ile Gly Leu Gln Ala Gln Arg Asn Val Pro Leu
 435 440 445

Thr Ile Tyr Pro Asp Met Asp Ala Leu Phe Thr Val Asn Pro Glu His
 450 455 460

Leu Ala Gly Val Asn Asp Thr Ile Arg Tyr Thr Val Gln Asn His Trp
 465 470 475 480

Leu Gly Ala Gly Ala Asn Leu Ile Ile Gly Gly Asp Met Glu Gln Val
 485 490 495

Asp Ala Leu Gly Leu Lys Leu Thr Thr Ser Lys Gln Ser Ile Asp Ala
 500 505 510

Ala Asp Phe Phe Ala Lys Tyr Pro Met Gln Pro Arg Asn Pro Gly Thr

515

520

525

Gly Ser Asn Ala Ala Lys Gln Leu Gln Ala Trp Ile Gly Gly Pro Ser
 530 535 540

Asp Asp His Glu Ala Tyr Val Leu Ile Val Asn Tyr Gly Pro Asp Leu
 545 550 555 560

Gly Asn Gly Gly Phe Ser Thr Lys Leu Tyr Gly Lys Gln Lys Val Thr
 565 570 575

Val Ser Leu Lys Asp Leu Gly Ile Ser Gly Ser Ala Trp Thr Phe Thr
 580 585 590

Asp Ile Trp Ser Gly Lys Ser Ser Arg Val Thr Gly Ser Tyr Ser Ala
 595 600 605

Trp Leu Thr Glu Gly Glu Ser Gln Leu Leu Arg Leu Lys Arg Thr His
 610 615 620

<210> 9
 <211> 302
 <212> BELOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> AXE1

<400> 9

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

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

Cys Pro Ala Ile His Val Phe Gly Ala Arg Glu Thr Thr Val Ser Gln
 35 40 45

Gly Tyr Gly Ser Ser Ala Thr Val Val Asn Leu Val Ile Gln Ala His
 50 55 60

Pro Gly Thr Thr Ser Glu Ala Ile Val Tyr Pro Ala Cys Gly Gly Gln
 65 70 75 80

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

Asn Ala Ala Ala Ala Ile Asn Asn Phe His Asn Ser Cys Pro Asp
 100 105 110

Thr Gln Leu Val Leu Val Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Gln Ile Phe Asp
 115 120 125

Asn Ala Leu Cys Gly Gly Asp Pro Gly Glu Gly Ile Thr Asn Thr
 130 135 140

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

Phe Met Gly Asp Pro Arg Asn Ile His Gly Leu Pro Tyr Asn Val Gly
 165 170 175

Thr Cys Thr Thr Gln Gly Phe Asp Ala Arg Pro Ala Gly Phe Val Cys
 180 185 190

Pro Ser Ala Ser Lys Ile Lys Ser Tyr Cys Asp Ala Ala Asp Pro Tyr
 195 200 205

Cys Cys Thr Gly Asn Asp Pro Asn Val His Gln Gly Tyr Gly Gln Glu
 210 215 220

Tyr Gly Gln Gln Ala Leu Ala Phe Ile Asn Ser Gln Leu Ser Ser Gly
 225 230 235 240

Gly Ser Gln Pro Pro Gly Gly Pro Thr Ser Thr Ser Arg Pro Thr
 245 250 255

Ser Thr Arg Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr Gln Thr His Trp Gly
 260 265 270

Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Pro Thr Gln Cys Glu Ser Gly
 275 280 285

Thr Thr Cys Gln Val Ile Ser Gln Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 290 295 300

<210> 10
 <211> 235
 <212> BEJLOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> AXE3

<400> 10

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

Leu Ala Thr Ala Thr Pro Met Asp Leu Glu Lys Arg Gln Cys Pro Gly
 20 25 30

Ile His Val Phe Gly Ala Arg Glu Thr Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Gly
 35 40 45

Ser Ser Ala Thr Val Val Asn Leu Ile Ile Asn Ala His Pro Gly Thr
 50 55 60

Thr Ala Glu Ala Ile Asn Tyr Pro Ala Cys Gly Gly Gln Ala Gln Cys
 65 70 75 80

Gly Gly Ile Ser Tyr Ala Asn Ser Val Val Ala Gly Ile Asn Ala Val
 85 90 95

Val Gln Ala Val Thr Asn Phe His Asn Arg Cys Pro Ser Thr Lys Leu
 100 105 110

Val Leu Val Gly Tyr Ser Gln Gly Gly Gln Ile Met Asp Asp Ala Leu
 115 120 125

Cys Gly Gly Gly Asp Pro Ala Glu Gly Tyr Pro Asn Thr Ala Val Pro
 130 135 140

Leu Pro Ala Ala Ala Val Ser Ala Ile Arg Ala Ala Ile Phe Met Gly
 145 150 155 160

Asp Pro Arg Tyr Val His Gly Leu Ala Tyr Asn Val Gly Ser Cys Gln
 165 170 175

Ala Gln Gly Phe Ala Pro Arg Asn Val Gly Phe Val Cys Pro Ser Gly
 180 185 190

Asn Lys Ile Lys Ser Tyr Cys Asp Ala Ser Asp Pro Tyr Cys Cys Asn
 195 200 205

Gly Asn Asn Ala Asn Thr His Gln Gly Tyr Gly Gln Glu Tyr Gly Gln
 210 215 220

Gln Ala Leu Ala Phe Val Asn Ser Leu Leu Gly
 225 230 235

<210> 11
 <211> 838
 <212> BEJIOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature

<223> EG6

<400> 11

Met Lys Val Ser Arg Val Leu Ala Leu Val Leu Gly Ala Val Ile Pro		
1	5	10
		15

Ala His Ala Ala Phe Ser Trp Lys Asn Val Lys Leu Gly Gly Gly		
20	25	30

Gly Phe Val Pro Gly Ile Ile Phe His Pro Lys Thr Lys Gly Val Ala		
35	40	45

Tyr Ala Arg Thr Asp Ile Gly Gly Leu Tyr Arg Leu Asn Ala Asp Asp		
50	55	60

Ser Trp Thr Ala Val Thr Asp Gly Ile Ala Asp Asn Ala Gly Trp His		
65	70	75
		80

Asn Trp Gly Ile Asp Ala Val Ala Leu Asp Pro Gln Asp Asp Gln Lys		
85	90	95

Val Tyr Ala Ala Val Gly Met Tyr Thr Asn Ser Trp Asp Pro Ser Asn		
100	105	110

Gly Ala Ile Ile Arg Ser Ser Asp Arg Gly Ala Thr Trp Ser Phe Thr		
115	120	125

Asn Leu Pro Phe Lys Val Gly Gly Asn Met Pro Gly Arg Gly Ala Gly		
130	135	140

Glu Arg Leu Ala Val Asp Pro Ala Asn Ser Asn Ile Ile Tyr Phe Gly		
145	150	160

Ala Arg Ser Gly Asn Gly Leu Trp Lys Ser Thr Asp Gly Gly Val Thr		
165	170	175

Phe Ser Lys Val Ser Ser Phe Thr Ala Thr Gly Thr Tyr Ile Pro Asp		
180	185	190

Pro Ser Asp Ser Asn Gly Tyr Asn Ser Asp Lys Gln Gly Leu Met Trp		
195	200	205

Val Thr Phe Asp Ser Thr Ser Ser Thr Thr Gly Gly Ala Thr Ser Arg		
210	215	220

Ile Phe Val Gly Thr Ala Asp Asn Ile Thr Ala Ser Val Tyr Val Ser		
225	230	235
		240

RU 2536 256 C2

Thr Asn Ala Gly Ser Thr Trp Ser Ala Val Pro Gly Gln Pro Gly Lys
245 250 255

Tyr Phe Pro His Lys Ala Lys Leu Gln Pro Ala Glu Lys Ala Leu Tyr
260 265 270

Leu Thr Tyr Ser Asp Gly Thr Gly Pro Tyr Asp Gly Thr Leu Gly Ser
275 280 285

Val Trp Arg Tyr Asp Ile Ala Gly Gly Thr Trp Lys Asp Ile Thr Pro
290 295 300

Val Ser Gly Ser Asp Leu Tyr Phe Gly Phe Gly Gly Leu Gly Leu Asp
305 310 315 320

Leu Gln Lys Pro Gly Thr Leu Val Val Ala Ser Leu Asn Ser Trp Trp
325 330 335

Pro Asp Ala Gln Leu Phe Arg Ser Thr Asp Ser Gly Thr Thr Trp Ser
340 345 350

Pro Ile Trp Ala Trp Ala Ser Tyr Pro Thr Glu Thr Tyr Tyr Ser
355 360 365

Ile Ser Thr Pro Lys Ala Pro Trp Ile Lys Asn Asn Phe Ile Asp Val
370 375 380

Thr Ser Glu Ser Pro Ser Asp Gly Leu Ile Lys Arg Leu Gly Trp Met
385 390 395 400

Ile Glu Ser Leu Glu Ile Asp Pro Thr Asp Ser Asn His Trp Leu Tyr
405 410 415

Gly Thr Gly Met Thr Ile Phe Gly Gly His Asp Leu Thr Asn Trp Asp
420 425 430

Thr Arg His Asn Val Ser Ile Gln Ser Leu Ala Asp Gly Ile Glu Glu
435 440 445

Phe Ser Val Gln Asp Leu Ala Ser Ala Pro Gly Gly Ser Glu Leu Leu
450 455 460

Ala Ala Val Gly Asp Asp Asn Gly Phe Thr Phe Ala Ser Arg Asn Asp
465 470 475 480

Leu Gly Thr Ser Pro Gln Thr Val Trp Ala Thr Pro Thr Trp Ala Thr
485 490 495

Ser Thr Ser Val Asp Tyr Ala Gly Asn Ser Val Lys Ser Val Val Arg
 500 505 510

Val Gly Asn Thr Ala Gly Thr Gln Gln Val Ala Ile Ser Ser Asp Gly
 515 520 525

Gly Ala Thr Trp Ser Ile Asp Tyr Ala Ala Asp Thr Ser Met Asn Gly
 530 535 540

Gly Thr Val Ala Tyr Ser Ala Asp Gly Asp Thr Ile Leu Trp Ser Thr
 545 550 555 560

Ala Ser Ser Gly Val Gln Arg Ser Gln Phe Gln Gly Ser Phe Ala Ser
 565 570 575

Val Ser Ser Leu Pro Ala Gly Ala Val Ile Ala Ser Asp Lys Lys Thr
 580 585 590

Asn Ser Val Phe Tyr Ala Gly Ser Gly Ser Thr Phe Tyr Val Ser Lys
 595 600 605

Asp Thr Gly Ser Ser Phe Thr Arg Gly Pro Lys Leu Gly Ser Ala Gly
 610 615 620

Thr Ile Arg Asp Ile Ala Ala His Pro Thr Thr Ala Gly Thr Leu Tyr
 625 630 635 640

Val Ser Thr Asp Val Gly Ile Phe Arg Ser Thr Asp Ser Gly Thr Thr
 645 650 655

Phe Gly Gln Val Ser Thr Ala Leu Thr Asn Thr Tyr Gln Ile Ala Leu
 660 665 670

Gly Val Gly Ser Gly Ser Asn Trp Asn Leu Tyr Ala Phe Gly Thr Gly
 675 680 685

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Tyr Ala Ser Gly Asp Ser Gly Ala Ser Trp
 690 695 700

Thr Asp Ile Gln Gly Ser Gln Gly Phe Gly Ser Ile Asp Ser Thr Lys
 705 710 715 720

Val Ala Gly Ser Gly Ser Thr Ala Gly Gln Val Tyr Val Gly Thr Asn
 725 730 735

Gly Arg Gly Val Phe Tyr Ala Gln Gly Thr Val Gly Gly Thr Gly
 740 745 750

Gly Thr Ser Ser Ser Thr Lys Gln Ser Ser Ser Ser Thr Ser Ser Ala
 755 760 765

Ser Ser Ser Thr Thr Leu Arg Ser Ser Val Val Ser Thr Thr Arg Ala
 770 775 780 800

Ser Thr Val Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Ala Ala Gly Pro Thr Gly
 785 790 800

Ser Gly Val Ala Gly His Tyr Ala Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr
 805 810 815

Gly Pro Thr Gln Cys Val Ala Pro Tyr Val Cys Gln Lys Gln Asn Asp
 820 825 830

Tyr Tyr Tyr Gln Cys Val
 835

<210> 12
 <211> 438
 <212> BEJOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> EG8

<400> 12

Met Arg Ala Thr Ser Leu Leu Ala Ala Ala Leu Ala Val Ala Gly Asp
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Gly Lys Ile Lys Tyr Leu Gly Val Ala Ile Pro Gly Ile
 20 25 30

Asp Phe Gly Cys Asp Ile Asp Gly Ser Cys Pro Thr Asp Thr Ser Ser
 35 40 45

Val Pro Leu Leu Ser Tyr Lys Gly Gly Asp Gly Ala Gly Gln Met Lys
 50 55 60

His Phe Ala Glu Asp Asp Gly Leu Asn Val Phe Arg Ile Ser Ala Thr
 65 70 75 80

Trp Gln Phe Val Leu Asn Asn Thr Val Asp Gly Lys Leu Asp Glu Leu
 85 90 95

Asn Trp Gly Ser Tyr Asn Lys Val Val Asn Ala Cys Leu Glu Thr Gly
 100 105 110

Ala Tyr Cys Met Ile Asp Met His Asn Phe Ala Arg Tyr Asn Gly Gly

115

120

125

Ile Ile Gly Gln Gly Gly Val Ser Asp Asp Ile Phe Val Asp Leu Trp
 130 135 140

Val Gln Ile Ala Lys Tyr Tyr Glu Asp Asn Asp Lys Ile Ile Phe Gly
 145 150 155 160

Leu Met Asn Glu Pro His Asp Leu Asp Ile Glu Ile Trp Ala Gln Thr
 165 170 175

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

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

Ser Thr Gly Ser Ala Glu Ala Leu Gly Lys Ile Thr Asn Pro Asp Gly
 210 215 220

Ser Thr Asp Leu Leu Tyr Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ile Asn
 225 230 240

Asn Ser Gly Ser His Ala Glu Cys Thr Thr Asp Asn Val Asp Ala Phe
 245 250 255

Asn Asp Phe Ala Asp Trp Leu Arg Gln Asn Lys Arg Gln Ala Ile Ile
 260 265 270

Ser Glu Thr Gly Ala Ser Met Glu Pro Ser Cys Met Thr Ala Phe Cys
 275 280 285

Ala Gln Asn Lys Ala Ile Ser Glu Asn Ser Asp Val Tyr Ile Gly Phe
 290 295 300

Val Gly Trp Gly Ala Gly Ser Phe Asp Thr Ser Tyr Ile Leu Thr Leu
 305 310 315 320

Thr Pro Leu Gly Lys Pro Gly Asn Tyr Thr Asp Asn Lys Leu Met Asn
 325 330 335

Glu Cys Ile Leu Asp Gln Phe Thr Leu Asp Glu Lys Tyr Arg Pro Thr
 340 345 350

Pro Thr Ser Ile Ser Thr Ala Ala Glu Glu Thr Ala Thr Ala Thr Ala
 355 360 365

Thr Ser Asp Gly Asp Ala Pro Ser Thr Thr Lys Pro Ile Phe Arg Glu

370

375

380

Glu Thr Ala Ser Pro Thr Pro Asn Ala Val Thr Lys Pro Ser Pro Asp
 385 390 395 400

Thr Ser Asp Ser Ser Asp Asp Asp Lys Asp Ser Ala Ala Ser Met Ser
 405 410 415

Ala Gln Gly Leu Thr Gly Thr Val Leu Phe Thr Val Ala Ala Leu Gly
 420 425 430

Tyr Met Leu Val Ala Phe
 435

<210> 13
 <211> 847
 <212> BEJOOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> GLR1

<400> 13

Met Val Ile Arg Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ile Val Pro
 1 5 10 15

Val Phe Ala Glu Ser Gly Ile Asp Ala Trp Leu Arg Tyr Ala Arg Leu
 20 25 30

Pro Ser Ser Ala Thr Arg Gly His Leu Thr Ser Phe Pro Asp Arg Ile
 35 40 45

Val Val Leu Asn Ala Ser Lys Asn Gly Pro Leu Ala Ser Ala Ser Ser
 50 55 60

Glu Leu His Lys Gly Ile Lys Gly Ile Leu Gly Leu Asp Leu Asp Val
 65 70 75 80

Ser Ser Arg Gly Gly Lys His Cys Ser Thr Gln Lys Ser Ile Val Ile
 85 90 95

Ser Thr Leu Asp Thr Tyr Gln Ser Ala Cys Gly Lys Leu Ser Pro Lys
 100 105 110

Leu Asn Leu Lys Glu Asp Gly Tyr Trp Leu Ser Thr Lys Gly Gly Ser
 115 120 125

Val Gln Ile Ile Gly Gln Asn Glu Arg Gly Ala Leu Tyr Gly Ala Phe
 130 135 140

RU 2536 256 C2

Gln Tyr Leu Ser Tyr Leu Gly Gln Gly Asp Phe Ser Gly Lys Ala Phe
145 150 155 160

Ala Ser Asn Pro Ser Ala Pro Val Arg Trp Ser Asn Gln Trp Asp Asn
165 170 175

Leu Asn Ala Ala Thr Ala Ala His Gly Ser Ile Glu Arg Gly Tyr Gly
180 185 190

Gly Pro Ser Ile Phe Phe Glu Asn Gly Leu Ile Lys Glu Asp Leu Ser
195 200 205

Arg Val Pro Leu Tyr Gly Arg Leu Leu Ala Ser Val Gly Leu Asn Gly
210 215 220

Ile Val Ile Asn Asn Val Asn Ala Asp Ala Asn Leu Leu Asn Glu Thr
225 230 235 240

Asn Leu Gln Gly Leu Lys Arg Ile Ala Asp Leu Phe Arg Pro Trp Gly
245 250 255

Val Asn Val Gly Ile Ser Leu Asn Phe Ala Ser Pro Gln Val Leu Gly
260 265 270

Asp Leu Ser Thr Phe Asp Pro Leu Asp Asp Ser Val Ile Lys Trp Trp
275 280 285

Thr Asp Lys Thr Asp Arg Ile Tyr Gln Leu Val Pro Asp Leu Ala Gly
290 295 300

Tyr Leu Val Lys Ala Asn Ser Glu Gly Gln Pro Gly Pro Leu Thr Tyr
305 310 315 320

Asn Arg Thr Leu Ala Glu Gly Ala Asn Leu Phe Ala Lys Ala Val Gln
325 330 335

Pro His Gly Gly Ile Val Val Phe Arg Ala Phe Val Tyr Asp Gln Leu
340 345 350

Asn Glu Thr Asp Trp Lys Ala Asp Arg Ala Asn Ala Ala Val Asp Phe
355 360 365

Phe Lys Ser Leu Asp Gly Gln Phe Asp Asp Asn Val Leu Val Gln Ile
370 375 380

Lys Tyr Gly Pro Ile Asp Phe Gln Val Arg Glu Pro Ala Ser Pro Leu
385 390 395 400

Phe Ala Asn Leu Pro Lys Thr Ala Val Ser Ile Glu Leu Glu Val Thr
 405 410 415

Gln Glu Tyr Leu Gly Gln Ser His Leu Val Tyr Leu Pro Pro Leu
 420 425 430

Trp Gln Thr Val Leu Gly Phe Asp Met Arg Tyr Asn Asn Arg Gln Ser
 435 440 445

Tyr Val Arg Asp Ile Ile Ser Gly Glu Val Phe Gly His Lys Leu Gly
 450 455 460

Gly Tyr Ala Gly Val Ile Asn Val Gly Met Asp Asp Thr Trp Leu Gly
 465 470 475 480

Ser His Leu Ala Met Ser Asn Met Phe Ala Tyr Gly Arg Leu Ala Trp
 485 490 495

Asn Pro Arg Ala Asp Ser Arg Asp Ile Val Glu Glu Trp Thr Arg Leu
 500 505 510

Thr Phe Gly Leu Asp Arg Asp Val Val Ser Thr Ile Ala Asp Met Ser
 515 520 525

Leu Lys Ser Trp Pro Ala Tyr Glu Gly Tyr Ser Gly Asn Leu Gly Ile
 530 535 540

Gln Thr Leu Thr Asp Ile Leu Tyr Thr His Tyr Gly Ala Asn Pro Ala
 545 550 555 560

Ser Gln Asp Asn Asn Gly Trp Gly Gln Trp Thr Arg Ala Asp Ser Lys
 565 570 575

Thr Ile Gly Met Asp Arg Thr Val Ser Asn Gly Thr Gly Asn Ala Gly
 580 585 590

Gln Tyr Pro Lys Glu Val Ala Ala Arg Phe Glu His Thr Gln Thr Thr
 595 600 605

Pro Asp Asp Leu Met Leu Trp Phe His His Val Pro Tyr Thr Phe Arg
 610 615 620

Leu His Ser Gly Lys Ser Val Ile Gln His Phe Tyr Asp Ala His Tyr
 625 630 635 640

Thr Gly Ala Ala Thr Val Gln Arg Phe Pro Ala Ala Trp Lys Ser Leu
 645 650 655

Lys Ser Lys Ile Asp Thr Glu Arg Tyr Asn Ala Val Leu Tyr Lys Leu
 660 665 670

Gln Tyr Gln Thr Gly His Ser Leu Val Trp Arg Asp Ala Ile Thr Glu
 675 680 685

Phe Tyr Arg Asn Leu Ser Ser Ile Pro Asp Gln Leu Asn Arg Val Arg
 690 695 700

Asn His Pro His Arg Ile Glu Ala Glu Asp Met Asp Leu Ser Gly Phe
 705 710 715 720

Thr Val Val Asn Val Ser Pro Thr Glu Cys Ala Ser Lys Tyr Lys Ala
 725 730 735

Ile Ala Thr Asn Gly Thr Gly Thr Ala Thr Thr Arg Leu Asn Val Pro
 740 745 750

Ser Gly Lys Tyr Thr Val Ala Val Asn Tyr Tyr Asp Val Ile Asn Gly
 755 760 765

Thr Ala Ser Tyr Asp Val Leu Leu Asn Gly Lys Ser Leu Gly Lys Trp
 770 775 780

Lys Gly Asp Ser Glu Thr His Leu Gly His Asp Phe Ser Thr Phe Leu
 785 790 795 800

Asp Cys His Ser Ala Ile Arg Ile Thr Phe Glu Gly Val Arg Ile Ser
 805 810 815

Arg Gly Asp Lys Leu Thr Ile Arg Gly Thr Gly Asn Ala Gln Glu Gln
 820 825 830

Ala Ala Ile Asp Tyr Val Ser Ile Leu Pro Gln Gly Val Val Asp
 835 840 845

<210> 14
 <211> 437
 <212> BEJOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> MAN1

<400> 14

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

Ala Leu Ala Ala Val Leu Gln Pro Val Pro Arg Ala Ser Ser Phe Val
 20 25 30

Thr Ile Ser Gly Thr Gln Phe Asn Ile Asp Gly Lys Val Gly Tyr Phe
 35 40 45

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

Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser Gly Leu Lys Val Val
 65 70 75 80

Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln Pro Ser Pro Gly Gln
 85 90 95

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

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

His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn Asn Trp Ser Asp Tyr
 130 135 140

Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly Gly Asn Ala Thr Thr
 145 150 155 160

Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr Arg Lys Tyr Val Gln
 165 170 175

Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala Ile Phe Ala Trp Glu
 180 185 190

Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser Thr Asp Val Ile Val
 195 200 205

Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys Ser Leu Asp Ser Asn
 210 215 220

His Leu Val Thr Leu Gly Asp Glu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Gly Asp
 225 230 235 240

Gly Ala Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr Asp Phe Ala Lys Asn
 245 250 255

Val Gln Ile Lys Ser Leu Asp Phe Gly Thr Phe His Leu Tyr Pro Asp
 260 265 270

RU 2536 256 C2

Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly Trp Ile Gln Thr His
 275 280 285

Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys Val Phe Glu Glu Tyr
 290 295 300

Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala Pro Trp Gln Thr Thr
 305 310 315 320

Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Asp Met Phe Trp Gln Trp Gly
 325 330 335

Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser Asp Pro Tyr Thr Val
 340 345 350

Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val Lys Asn His Val Asp
 355 360 365

Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Pro Pro Pro Val Ser Ser Thr Thr
 370 375 380

Thr Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Thr Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ser
 385 390 395 400

Cys Ser Pro Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Tyr Thr Gly Pro
 405 410 415

Thr Cys Cys Ala Gln Gly Thr Cys Ile Tyr Ser Asn Tyr Trp Tyr Ser
 420 425 430

Gln Cys Leu Asn Thr
 435

<210> 15
 <211> 379
 <212> BELOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> PEC2

<400> 15

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

Val Gln Ala His Ala Val Pro Pro Pro Thr Val Thr Gln Ala Pro Lys
 20 25 30

Leu Glu Asp Arg Ala Thr Thr Cys Thr Phe Ser Gly Ser Asn Gly Ala
 35 40 45

Ser Ser Ala Ser Lys Ser Gln Lys Ser Cys Ala Thr Ile Val Leu Ser
 50 55 60

Asn Val Ala Val Pro Ser Gly Val Thr Leu Asp Leu Ser Asp Leu Asn
 65 70 75 80

Asp Gly Thr Thr Val Ile Phe Glu Gly Thr Thr Trp Gly Tyr Lys
 85 90 95

Glu Trp Ser Gly Pro Leu Leu Gln Ile Glu Gly Asn Asp Ile Thr Ile
 100 105 110

Gln Gly Ala Ser Gly Ala Val Leu Asn Pro Asp Gly Ala Arg Trp Trp
 115 120 125

Asp Gly Gln Gly Gly Asn Gly Gly Lys Thr Lys Pro Lys Phe Phe Ala
 130 135 140

Ala His Asp Leu Thr Ser Ser Ser Ile Thr Asn Leu Tyr Ile Lys Asn
 145 150 155 160

Thr Pro Val Gln Ala Val Ser Val Asn Gly Val Asn Gly Leu Thr Ile
 165 170 175

Thr Gly Met Thr Ile Asp Asn Ser Ala Gly Asp Ser Gly Gly His
 180 185 190

Asn Thr Asp Gly Phe Asp Ile Gly Ser Ser Ser Asn Val Val Ile Ser
 195 200 205

Gly Ala Lys Val Tyr Asn Gln Asp Asp Cys Val Ala Val Asn Ser Gly
 210 215 220

Thr Asn Ile Thr Phe Thr Gly Gly Leu Cys Ser Gly Gly His Gly Leu
 225 230 235 240

Ser Ile Gly Ser Val Gly Gly Arg Asp Asp Asn Thr Val Gln Thr Val
 245 250 255

Thr Phe Ser Asn Ser Gln Val Thr Lys Ser Ala Asn Gly Ile Arg Ile
 260 265 270

Lys Ala Thr Ala Gly Lys Thr Gly Thr Ile Lys Gly Val Thr Tyr Thr
 275 280 285

Gly Ile Thr Leu Ser Ser Ile Thr Gly Tyr Gly Ile Leu Ile Glu Gln
 290 295 300

Asn Tyr Asp Gly Gly Asp Leu His Gly Ser Pro Thr Ser Gly Ile Pro
 305 310 315 320

Ile Thr Asn Leu Val Leu Gln Asn Ile Ser Gly Ser Asn Gly Val Val
 325 330 335

Ser Ser Gly Asn Asn Ile Ala Ile Val Cys Gly Ser Gly Ala Cys Ser
 340 345 350

Asn Trp Thr Trp Ser Asn Val Val Val Thr Gly Gly Lys Lys Tyr Gly
 355 360 365

Ser Cys Gln Asn Val Pro Ser Pro Ala Thr Cys
 370 375

<210> 16
 <211> 229
 <212> BEJOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> XYN1

<400> 16

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

Thr Leu Ala Met Pro Thr Gly Leu Glu Pro Glu Ser Ser Val Asn Val
 20 25 30

Thr Glu Arg Gly Met Tyr Asp Phe Val Leu Gly Ala His Asn Asp His
 35 40 45

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

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

Thr Gln Asp Asp Phe Val Val Gly Val Gly Trp Thr Thr Gly Ser Ser
 85 90 95

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

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

115

120

125

Ile Met Glu Asp Asn His Asn Tyr Pro Ala Gln Gly Thr Val Lys Gly
 130 135 140

Thr Val Thr Ser Asp Gly Ala Thr Tyr Thr Ile Trp Glu Asn Thr Arg
 145 150 155 160

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

Ser Val Arg Asn Ser Pro Arg Thr Ser Gly Thr Val Thr Val Gln Asn
 180 185 190

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

Tyr Gln Val Val Ala Val Glu Gly Trp Gly Gly Ser Gly Ser Ala Ser
 210 215 220

Gln Ser Val Ser Asn
 225

<210> 17
 <211> 797
 <212> BEJOK
 <213> Trichoderma reesei

<220>
 <221> misc_feature
 <223> BXL1

<400> 17

Met Val Asn Asn Ala Ala Leu Leu Ala Ala Leu Ser Ala Leu Leu Pro
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Ala Gln Asn Asn Gln Thr Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Gln
 20 25 30

Gly Gln Pro Asp Leu Tyr Pro Glu Thr Leu Ala Thr Leu Thr Leu Ser
 35 40 45

Phe Pro Asp Cys Glu His Gly Pro Leu Lys Asn Asn Leu Val Cys Asp
 50 55 60

Ser Ser Ala Gly Tyr Val Glu Arg Ala Gln Ala Leu Ile Ser Leu Phe
 65 70 75 80

Thr Leu Glu Glu Leu Ile Leu Asn Thr Gln Asn Ser Gly Pro Gly Val
 85 90 95

Pro Arg Leu Gly Leu Pro Asn Tyr Gln Val Trp Asn Glu Ala Leu His
 100 105 110

Gly Leu Asp Arg Ala Asn Phe Ala Thr Lys Gly Gly Gln Phe Glu Trp
 115 120 125

Ala Thr Ser Phe Pro Met Pro Ile Leu Thr Thr Ala Ala Leu Asn Arg
 130 135 140

Thr Leu Ile His Gln Ile Ala Asp Ile Ile Ser Thr Gln Ala Arg Ala
 145 150 155 160

Phe Ser Asn Ser Gly Arg Tyr Gly Leu Asp Val Tyr Ala Pro Asn Val
 165 170 175

Asn Gly Phe Arg Ser Pro Leu Trp Gly Arg Gly Gln Glu Thr Pro Gly
 180 185 190

Glu Asp Ala Phe Phe Leu Ser Ser Ala Tyr Thr Tyr Glu Tyr Ile Thr
 195 200 205

Gly Ile Gln Gly Gly Val Asp Pro Glu His Leu Lys Val Ala Ala Thr
 210 215 220

Val Lys His Phe Ala Gly Tyr Asp Leu Glu Asn Trp Asn Asn Gln Ser
 225 230 235 240

Arg Leu Gly Phe Asp Ala Ile Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ser Glu Tyr
 245 250 255

Tyr Thr Pro Gln Phe Leu Ala Ala Ala Arg Tyr Ala Lys Ser Arg Ser
 260 265 270

Leu Met Cys Ala Tyr Asn Ser Val Asn Gly Val Pro Ser Cys Ala Asn
 275 280 285

Ser Phe Phe Leu Gln Thr Leu Leu Arg Glu Ser Trp Gly Phe Pro Glu
 290 295 300

Trp Gly Tyr Val Ser Ser Asp Cys Asp Ala Val Tyr Asn Val Phe Asn
 305 310 315 320

Pro His Asp Tyr Ala Ser Asn Gln Ser Ser Ala Ala Ala Ser Ser Leu
 325 330 335

Arg Ala Gly Thr Asp Ile Asp Cys Gly Gln Thr Tyr Pro Trp His Leu
 340 345 350

Asn Glu Ser Phe Val Ala Gly Glu Val Ser Arg Gly Glu Ile Glu Arg
 355 360 365

Ser Val Thr Arg Leu Tyr Ala Asn Leu Val Arg Leu Gly Tyr Phe Asp
 370 375 380

Lys Lys Asn Gln Tyr Arg Ser Leu Gly Trp Lys Asp Val Val Lys Thr
 385 390 395 400

Asp Ala Trp Asn Ile Ser Tyr Glu Ala Ala Val Glu Gly Ile Val Leu
 405 410 415

Leu Lys Asn Asp Gly Thr Leu Pro Leu Ser Lys Lys Val Arg Ser Ile
 420 425 430

Ala Leu Ile Gly Pro Trp Ala Asn Ala Thr Thr Gln Met Gln Gly Asn
 435 440 445

Tyr Tyr Gly Pro Ala Pro Tyr Leu Ile Ser Pro Leu Glu Ala Ala Lys
 450 455 460

Lys Ala Gly Tyr His Val Asn Phe Glu Leu Gly Thr Glu Ile Ala Gly
 465 470 475 480

Asn Ser Thr Thr Gly Phe Ala Lys Ala Ile Ala Ala Ala Lys Lys Ser
 485 490 495

Asp Ala Ile Ile Tyr Leu Gly Gly Ile Asp Asn Thr Ile Glu Gln Glu
 500 505 510

Gly Ala Asp Arg Thr Asp Ile Ala Trp Pro Gly Asn Gln Leu Asp Leu
 515 520 525

Ile Lys Gln Leu Ser Glu Val Gly Lys Pro Leu Val Val Leu Gln Met
 530 535 540

Gly Gly Gly Gln Val Asp Ser Ser Ser Leu Lys Ser Asn Lys Lys Val
 545 550 555 560

Asn Ser Leu Val Trp Gly Gly Tyr Pro Gly Gln Ser Gly Gly Val Ala
 565 570 575

Leu Phe Asp Ile Leu Ser Gly Lys Arg Ala Pro Ala Gly Arg Leu Val
 580 585 590

Thr Thr Gln Tyr Pro Ala Glu Tyr Val His Gln Phe Pro Gln Asn Asp
 595 600 605

Met Asn Leu Arg Pro Asp Gly Lys Ser Asn Pro Gly Gln Thr Tyr Ile
610 615 620

Trp Tyr Thr Gly Lys Pro Val Tyr Glu Phe Gly Ser Gly Leu Phe Tyr
625 630 635 640

Thr Thr Phe Lys Glu Thr Leu Ala Ser His Pro Lys Ser Leu Lys Phe
645 650 655

Asn Thr Ser Ser Ile Leu Ser Ala Pro His Pro Gly Tyr Thr Tyr Ser
660 665 670

Glu Gln Ile Pro Val Phe Thr Phe Glu Ala Asn Ile Lys Asn Ser Gly
675 680 685

Lys Thr Glu Ser Pro Tyr Thr Ala Met Leu Phe Val Arg Thr Ser Asn
690 695 700

Ala Gly Pro Ala Pro Tyr Pro Asn Lys Trp Leu Val Gly Phe Asp Arg
705 710 715 720

Leu Ala Asp Ile Lys Pro Gly His Ser Ser Lys Leu Ser Ile Pro Ile
725 730 735

Pro Val Ser Ala Leu Ala Arg Val Asp Ser His Gly Asn Arg Ile Val
740 745 750

Tyr Pro Gly Lys Tyr Glu Leu Ala Leu Asn Thr Asp Glu Ser Val Lys
755 760 765

Leu Glu Phe Glu Leu Val Gly Glu Glu Val Thr Ile Glu Asn Trp Pro
770 775 780

Leu Glu Glu Gln Gln Ile Lys Asp Ala Thr Pro Asp Ala
785 790 795