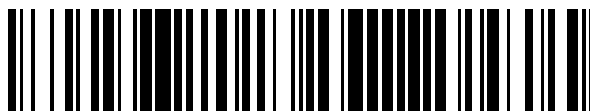


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 427**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009 E 09834135 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2382309**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de xilanasa**

30 Prioridad:

23.12.2008 EP 08172749

21.01.2009 US 146155 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2016

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)**

**Langebrogade 1, Postboks 17
1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:

**SIBBESEN, OLE y
SØRENSEN, JENS FRISBÆK**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 561 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de xilanasas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de xilanasas y sus usos. La presente invención también se refiere a un método para modificar polipéptidos con actividad de xilanasas que afecte, preferiblemente que incremente, la actividad de xilanasas y/o la solubilidad del salvado.

Antecedentes de la invención

10 Durante muchos años, las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (denominadas en este documento xilanasas) se han usado para modificar carbohidratos complejos derivados de materiales de la pared celular de las plantas. Es bien sabido en la técnica que la funcionalidad de las diferentes xilanasas (derivadas de diferentes microorganismos o plantas) difiere enormemente. Basado en la información estructural y genética, las xilanasas han sido clasificadas en diferentes familias de Glucósido Hidrolasa (GH) (Henrissat, 1991; Coutinho y Henrissat, 1999). Hasta hace poco, todas las xilanasas conocidas y caracterizadas pertenecían a las familias GH10 o GH11. Recientes trabajos han identificado otros numerosos tipos de xilanasas pertenecientes a las familias GH5, GH7, GH8 y GH43 (Coutinho y 15 Henrissat, 1999; Collins *et al.*, 2005). Hasta ahora la familia GH11 difiere de todas las otras GH, que consiste en solamente la única familia de xilanasas específicas de xilano. La estructura de las xilanasas GH11 puede describirse como una estructura β -enrollada (véase la Figura 1, discutida en este documento).

El documento de EE.UU. 6.682.923 se refiere a la actividad de proteínas y ácidos nucleicos de xilanasas.

20 Se han realizado estudios integrales que caracterizan la funcionalidad de xilanasas en sustratos bien caracterizados y puros (Kormelink *et al.*, 1992). Estos estudios muestran que diferentes xilanasas tienen diferentes requerimientos específicos con respecto a la sustitución de la estructura de xilosa del arabinoxilano (AX). Algunas xilanasas requieren tres restos de xilosa no sustituidos para hidrolizar la estructura de xilosa; otros requieren solo uno o dos. Las razones para estas diferencias en la especificidad se piensan que son debidas a la estructura tridimensional dentro de los dominios catalíticos, los cuales son a su vez dependientes de la estructura primaria de la xilanasas, es 25 decir, de la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la traducción de estas diferencias en la secuencia de aminoácidos en diferencias en la funcionalidad de las xilanasas, hasta ahora todavía no ha sido documentada cuando la xilanasas actúa en un medio complejo, tal como materiales de plantas.

30 Los sustratos de xilanasas encontrados en trigo (harina de trigo) han sido divididos tradicionalmente en dos fracciones: El AX no extraíble en agua (WU-AX) y el AX extraíble en agua (WE-AX). La proporción WU-AX:WE-AX es de aprox. 70:30 en la harina del trigo. Han habido numerosas explicaciones de porque hay diferentes fracciones de AX. La literatura más antigua (D'Appolonia y MacArthur (1976) y Montgomery y Smith (1955)) describe muchas diferencias esenciales en el grado de sustitución entre WE-AX y WU-AX. El grado de sustitución más alto fue encontrado en WE-AX. Este se usó para explicar porque algunos de los AX eran extraíbles. El alto grado de sustitución hizo al polímero soluble, comparado con un grado de sustitución inferior, lo que causa puentes de 35 hidrógeno entre low polímeros y, consecuentemente, su precipitación.

La diferencia entre la funcionalidad de diferentes xilanasas se ha pensado que es debida a diferencias en la especificidad de la xilanasas y, por ello, a su preferencia para los sustratos WU-AX o WE-AX.

40 Sin embargo, la literatura más reciente no encuentra las mismas grandes diferencias entre el grado de sustitución del WE-AX y el WU-AX. Por ello, otros parámetros diferentes a la especificidad del sustrato de xilanasas podrían ser de importancia. Estos parámetros pueden ser la preferencia de las xilanasas por WE-AX *versus* WU-AX, determinada por otros medios diferentes a la especificidad del sustrato clásica. Este parámetro puede encontrarse descrito en la literatura como la selectividad por el sustrato.

45 En algunas aplicaciones (por ejemplo, en panadería) es deseable producir polímeros solubles de alto peso molecular (APM) a partir de la fracción WU-AX. Dichos polímeros se han correlacionado con un incremento del volumen en la producción del pan (Rouau, 1993; Rouau *et al.*, 1994 y Courtin *et al.*, 1999).

En otras aplicaciones es deseable modificar tanto WU-AX como WE-AX, solubilizar el WU-AX, haciendo el peso molecular más bajo, reducir su efecto hidrocoloide, producir oligosacáridos de arabinoxilano, dando acceso a una posterior degradación de otros componentes de la pared celular (tal como en la producción de galletas, la separación de harinas, la aplicación en alimentos, la producción de bio-etanol, los prebióticos, etc.).

50 El documento WO03/020923 se refiere a variantes de xilanasas con sensibilidad alterada respecto a los inhibidores de xilanasas. El documento WO 02/38746 se refiere a proteínas de xilanasas con mayor termoestabilidad y alcalofilia.

Todas las características mencionadas anteriormente de xilanasas usadas en diversas aplicaciones se dirigen al comportamiento de las xilanasas y son de gran importancia para lograr la funcionalidad necesitada. Sin embargo, la selección de xilanasas con las características adecuadas para una cierta aplicación o ingeniería conocida de las

xilanasas para lograrla, a menudo resulta en una menor eficacia de la molécula de xilanasas, por ejemplo, una molécula con baja actividad catalítica (es decir, actividad específica caracterizada por las unidades de moléculas/mg de proteína xilanasas). Ya que estas moléculas van a usarse en aplicaciones comerciales, es por tanto de gran importancia disponer de una actividad catalítica tan alta como sea posible. La mejora de esta característica será de más y más importancia para lograr la aplicación comercial de estas enzimas en el futuro, debido al mayor uso de productos secundarios agrícolas tales como el cereal salvado o el uso en la producción de bio-etanol celulósico.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al sorprendente hallazgo de que es posible – mediante la modificación de un polipéptido con actividad de xilanasas en la posición 110 comparado con la secuencia del polipéptido de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1- incrementar la solubilización del salvado y/o la actividad de xilanasas de la enzima.

Por tanto, se ha mostrado por los inventores de la presente invención que es posible producir polipéptidos de xilanasas con una mayor actividad de xilanasas y/o solubilización del salvado. Esto hará posible, por ejemplo, hidrolizar la fracción hemicelulósica durante el procesamiento en relación a la producción de bioetanol celulósico, o permitirá la reducción en la cantidad de xilanasas requerida en un número de aplicaciones tales como la alimentación animal, la licuefacción de almidón, la panadería, la separación de harinas (molienda húmeda), la producción de agentes prebióticos y la producción de papel y pulpa.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos una identidad del 88% con SEQ ID No. 1, y cuyo polipéptido tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 110 con cualquier otro resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: asparagina (N), ácido glutámico (E), triptófano (W), alanina (A) y cisteína (C), y una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: 11F, 12F, 122D, 113A, 13Y, 54Q, 54W, 113D, 141Q, 175L, 122F, 34K, 99Y, 104W, 154R, 159D, 175K, 811, 166F, 162E, 162D, 164F, 114D, 114Y, 114F, 118V, 175K, 77L, 77M, 77V, y 77Y, estando determinada la(s) posición(ones) como la(s) posición(ones) correspondiente(s) de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1; en donde la variante de xilanasas tiene una mejor solubilización de la actividad del salvado, más alta que la que puede obtenerse mediante el uso de la correspondiente xilanasas tipo salvaje de SEQ ID No. 1.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un polipéptido de la invención, comprendiendo dicho método expresar una secuencia de nucleótidos que codifica a dicho polipéptido; y opcionalmente aislar y/o purificar el polipéptido después de la expresión.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del polipéptido de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención en un método para modificar materiales de plantas.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 88% con SEQ ID No. 1 o con al menos una identidad del 75% con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de SEQ ID No. 2-22, y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 88% con SEQ ID No. 1 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 75% con SEQ ID No. 2 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 75% con SEQ ID No. 3 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un método para identificar un polipéptido de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método:

5 (i) preparar un polipéptido con al menos una identidad del 88% con SEQ ID No. 1 o con al menos una identidad del 75% con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de SEQ ID No. 2-22 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento;

10 (ii) comparar la solubilización del salvado y/o la actividad de xilanasa de dicho polipéptido con la solubilización del salvado y/o la actividad de xilanasa de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre las SEQ ID NOs: 1-22 con las cuales tienen el porcentaje más alto de identidad; y

(iii) seleccionar el polipéptido si tiene mejor solubilización del salvado y/o mejor actividad de xilanasa comparado con la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOs: 1-22 con la cual tiene el porcentaje más alto de identidad.

15 En un aspecto más, la presente invención se refiere a un método para preparar un polipéptido de acuerdo con la invención, comprendiendo dicho método expresar una secuencia de nucleótidos que codifica a dicho polipéptido; y opcionalmente aislar y/o purificar el polipéptido después de la expresión.

20 En algunas realizaciones el polipéptido se prepara modificando tanto una secuencia del polipéptido de aminoácidos en la posición 110 como un codón que codifique un resto de aminoácido en la posición 110 en una secuencia de nucleótidos que codifique una secuencia del polipéptido de aminoácidos, en donde la posición 110 se determina con referencia a la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

También se describe en este documento un vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

25 También se describe en este documento una célula que se ha transformado con la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención o el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

30 También se describe en este documento un organismo huésped que se ha transformado con la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención o el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención.

En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido identificado de acuerdo con los métodos de la invención.

35 En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido preparado de acuerdo con la invención.

40 En un aspecto más, la presente invención se refiere a una composición que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención. También se describe en este documento una composición que comprende el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

También se describe en este documento una composición que comprende la célula que se ha transformado con la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

También se describe en este documento una composición que comprende el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

45 También se describe en este documento una composición que comprende el organismo que se ha transformado con la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención o el vector que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico.

50 También se describe en este documento una masa que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o un polipéptido identificado de acuerdo con la invención o un polipéptido preparado de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención o la célula de acuerdo

con la invención o el organismo de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención.

5 También se describe en este documento un producto de panadería que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o un polipéptido identificado de acuerdo con la invención o un polipéptido preparado de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención o la célula de acuerdo con la invención o el organismo de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención o una masa de acuerdo con la invención.

10 También se describe en este documento una alimentación animal que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o un polipéptido identificado de acuerdo con la invención o un polipéptido preparado de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención o la célula de acuerdo con la invención o el organismo de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención.

15 También se describe en este documento una composición de limpieza que comprende xilanasas. En algunas realizaciones, las composiciones de limpieza son composiciones de detergente de lavadora, mientras que en otras realizaciones las composiciones de limpieza son detergentes para lavavajillas. En algunas otras realizaciones, los detergentes para lavavajillas son detergentes de lavavajillas automáticos. En algunas realizaciones adicionales, las composiciones de limpieza que contienen xilanasas comprenden además una o más enzimas adicionales. En algunas realizaciones, las enzimas adicionales se seleccionan a partir de hemicelulasas, celulasas, peroxidasas, proteasas, xilanasas, lipasas, fosfolipasas, esterases, cutinasas, pectinasas, pectato liasas, mananasas, queratinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, lipoxigenasas, ligninasas, pululaninas, tanasas, pentosaninas, malanasas, β -glucanasas, arabinosidasas, hialuronidasas, condroitinasas, lacasa y amilasas, o sus mezclas. En algunas realizaciones, encuentra uso una combinación de enzimas (es decir, un "coctel").

20 También se describe en este documento un método para degradar o modificar una pared celular de la planta, cuyo método comprende poner en contacto dicha pared celular de las plantas con el polipéptido de acuerdo con la invención o un polipéptido identificado de acuerdo con la invención o un polipéptido preparado de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención o la célula de acuerdo con la invención o el organismo de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención.

25 También se describe en este documento un método para procesar materiales de plantas cuyo método comprende poner en contacto dichos materiales de plantas con el polipéptido de acuerdo con cualquiera de la invención o un polipéptido identificado de acuerdo con la invención o un polipéptido preparado de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención o la célula de acuerdo con la invención o el organismo de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención.

30 También se describe en este documento el uso del polipéptido de acuerdo con la invención o un polipéptido identificado de acuerdo con la invención o un polipéptido preparado de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención o la célula de acuerdo con la invención o el organismo de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención en un método para modificar materiales de plantas.

35 También se describe en este documento el uso del polipéptido de acuerdo con la invención o un polipéptido identificado de acuerdo con la invención o un polipéptido preparado de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención o la célula de acuerdo con la invención o el organismo de acuerdo con la invención en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la invención en uno cualquiera o más de: horneado, procesamiento de cereales, licuefacción de almidón, producción de bio-etanol a partir de material celulósico, alimentación animal, en el procesamiento de madera y en el potenciamiento del blanqueamiento de la pulpa de madera.

40 También se describe en este documento un polipéptido o su fragmento sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.

45 También se describe en este documento un método sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.

50 También se describe en este documento una composición sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.

También se describe en este documento el uso sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.

Leyendas de las figuras

Se hace referencia en este documento a las siguientes Figuras.

La Figura 1 muestra una variante de xilanasa XynA de *Bacillus subtilis* (T110A) (negro), variante de xilanasa Xyn2 de *Trichoderma reesei* (T120A) (gris oscuro) y una variante de xilanasa XynA de *Thermomyces lanuginosus* (T120A) (gris claro) sobrepuestas. Los restos mutados, T110 y T120, respectivamente, se destacan.

La Figura 2 muestra un alineamiento múltiple de secuencia de SEQ ID NO:1-22 en el Programa AlignX (parte del paquete vector NTI) con parámetros estándar para múltiple alineamiento (penalización para la inclusión de un hueco: 10 og penalización para la extensión de un hueco 0,05). Los números a la izquierda de la secuencia representan las SEQ ID NO.

Descripción detallada de la invención

Se han publicado enzimas xilanasas derivadas de casi 100 organismos diferentes, incluyendo plantas, hongos y bacterias. Las enzimas xilanasas se clasifican en varias de las más de 40 familias de enzimas de glicosil hidrolasa. Las enzimas de glicosil hidrolasa, que incluyen xilanasas, mananasas, amilasas, β -glucanasas, celulasas y otras carbohidrasas, se clasifican según propiedades tales como la secuencia de aminoácidos, la estructura tridimensional y la geometría del sitio catalítico (Gilkes, *et al.*, 1991, Microbiol. Reviews 55: 303-315).

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasa y que comprende al menos tres, tal como cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos respecto a cualquier otra secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1-22, y cuyo polipéptido tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasa y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos una identidad del 88% con SEQ ID No. 1 o con al menos una identidad del 75% con una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de 2-22 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

La posición de un aminoácido particular dentro de un polipéptido de acuerdo con la presente invención se determina por alineamiento de la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido con SEQ ID No. 1 usando la herramienta de alineamiento estándar de secuencia, tal como por alineamiento de dos secuencias usando el algoritmo de Smith-Waterman, o con los algoritmos de CLUSTALW2, en donde las secuencias se dice que se alinean cuando la puntuación del alineamiento es la más alta. La puntuación del alineamiento puede ser calculada de acuerdo con los métodos descritos por Wilbur, W. J. y Lipman, D. J. (1983) "Rapid similarity searches of ácidos nucleicos and protein data banks". Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 726-730. Preferiblemente, se usan parámetros estándar en el algoritmo ClustalW2 (1.82): Penalización para la inclusión de un hueco de proteína = 10,0; Penalización para la extensión de un hueco de proteína = 0,2; Matriz de proteína = Gonnet; ENDGAP de Proteína/ADN = -1; GAPDIST de Proteína/ADN = 4.

Preferiblemente una posición de los aminoácidos particulares dentro de un polipéptido de acuerdo con la presente invención se determina por alineamiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido con SEQ ID No. 1 usando el Programa AlignX (parte del paquete del vector NTI) con parámetros estándar para múltiple alineamiento (Penalización para la inclusión de un hueco: 10 og Penalización para la extensión de un hueco 0,05). Para algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, el alineamiento puede realizarse usando la Figura 2 como se describe en este documento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasa y con una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 88% con SEQ ID No. 1 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasa y con al menos una identidad del 75% con SEQ ID No. 2 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasa y con al menos una identidad del 75% con SEQ ID No. 3 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasas y con al menos una identidad del 75% con SEQ ID No. 4 y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácidos en la posición 110, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

5 También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad del 75% con SEQ ID No. 1 y cuyo polipéptido tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 110 respecto a cualquier otro resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: ácido glutámico, triptófano, alanina y cisteína, en donde dicha posición 110 se determina como la posición correspondiente a la posición 110 de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineamiento.

10 A menos que se diga otra cosa, la expresión "identidad de secuencia" para aminoácidos, según se usa en este documento, se refiere a la identidad de secuencia calculada como $(n_{ref} - n_{dif}) \cdot 100 / n_{ref}$, en donde n_{dif} es el número total de restos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en donde n_{ref} es el número de restos en una de las secuencias. Por tanto, la secuencia de aminoácidos ASTDYWQNWWT tendrá una identidad de secuencia del 80% con la secuencia ASTGYWQAWT ($n_{dif}=2$ y $n_{ref}=10$).

15 En algunas realizaciones, la identidad de secuencia se determina mediante métodos convencionales, por ejemplo, Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, usando el algoritmo CLUSTAL W de Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Res 22:467380, por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group). El algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990, Mol. Biol. 215:403-10) cuyo software puede obtenerse a través del National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov/) también puede usarse. Cuando se usa cualquiera de los algoritmos anteriormente mencionados, se usan los parámetros estándar para longitud "Window", penalización de hueco, etc.

20 El término "modificación" según se usa en este documento significa cualquier modificación química a cualquiera de los aminoácidos o a la secuencia de aminoácidos del polipéptido seleccionado a partir de SEQ ID NO: 1-22, así como la manipulación genética del ADN que codifica tal polipéptido. Las modificaciones pueden ser sustituciones, deleciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos así como remplazos de una o más cadenas laterales de aminoácidos. En algunas realizaciones, los polipéptidos que tienen actividad de xilanasas solo tienen sustituciones de aminoácidos respecto a SEQ ID No. 1-22.

30 Debe entenderse que la "modificación" en un polipéptido dado es respecto al polipéptido seleccionado a partir de SEQ ID NO: 1-22 con el porcentaje más alto identidad de secuencia a este polipéptido dado.

35 La terminología para las sustituciones de aminoácidos usada en esta descripción es como sigue. La primera letra representa los aminoácidos naturalmente presentes en una posición de una particular secuencia. El siguiente número representa la posición respecto a SEQ ID No. 1. La segunda letra representa los diferentes aminoácidos que sustituyen a los aminoácidos naturales. Un ejemplo es D11F/R122D/T110A, en donde el ácido aspártico en la posición 11 de SEQ ID NO:1 está remplazado por una fenilalanina y la arginina en la posición 122 de SEQ ID NO:1 está remplazada por un ácido aspártico, y la treonina en la posición 110 está remplazada por una alanina, estando todas las tres mutaciones en el mismo polipéptido con actividad de xilanasas.

40 Aparte de las modificaciones de aminoácidos en los polipéptidos con actividad de xilanasas de acuerdo con la invención, los polipéptidos pueden tener otras modificaciones de aminoácidos de una naturaleza menor, que son sustituciones conservativas de aminoácidos o inserciones que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de amino- o carboxil-terminal, tal como un resto de metionina amino-terminal; un pequeño péptido enlazante de hasta aproximadamente 20-25 restos; o una pequeña extensión que facilite la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polo-histidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

45 Ejemplos de sustituciones conservativas están dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en H. Neurath y R. L. Hill, 1979, en, The Proteins, Academic Press, New York. Los cambios más comúnmente aparecidos son Ala por Ser, Val por Ile, Asp por Glu, Thr por Ser, Ala por Gly, Ala por Thr, Ser por Asn, Ala por Val, Ser por Gly, Tyr por Phe, Ala por Pro, Lys por Arg, Asp por Asn, Leu por Ile, Leu por Val, Ala por Glu y Asp por Gly.

55 Además de los 20 aminoácidos estándar, pueden sustituirse aminoácidos no estándar (tal como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) con restos de aminoácidos de un polipéptido tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no se van a codificar por el código genético y aminoácidos no naturales pueden sustituirse con restos de aminoácidos. Los "aminoácidos no

naturales" se han modificado después de la síntesis de proteínas y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferentes de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales pueden sintetizarse químicamente, y preferiblemente, están comercialmente disponibles e incluyen ácido piperídico, ácido tiazolidina carboxílico, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

- 5 La expresión "organismo huésped", según se usa en este documento, incluye cualquier célula tipo que sea susceptible de transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprenda un polinucleótido que codifica los polipéptidos de la presente invención.

Para los presentes fines, una xilanasa significa una proteína o un polipéptido con actividad de xilanasa.

- 10 La frase "un polipéptido con actividad de xilanasa" según se usa en este documento se refiere a cualquier proteína o polipéptido que tenga actividad en un ensayo de xilanasa tal como se describe en este documento.

- La actividad de xilanasa puede medirse usando cualquier ensayo, en el que se emplea un sustrato que incluye endo-enlaces 1,4-beta- D-xilosídicos en los xilanos. El pH y la temperatura usada en el ensayo tienen que ser adaptados a la xilanasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH adecuados son 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó 11. Ejemplos de temperaturas adecuadas son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 ó 80°C. Diferentes tipos de sustratos están disponibles para la determinación de la actividad de xilanasa por ejemplo comprimidos de Xylazyme (reticulados, sustrato de xilano teñido, Megazyme, Bray, Irlanda).
- 15

Preferiblemente, la actividad de xilanasa se mide usando el siguiente ensayo.

Ensayo de Xilanasa (Actividad de endo-β-1,4-xilanasa)

- Las muestras fueron diluidas en tampón de ácido cítrico (0,1 M) - hidrógeno-fosfato de di-sodio (0,2 M), pH 5,0, para obtener aprox. una OD₅₉₀ = 0,7 en este ensayo. Tres diferentes diluciones de la muestra fueron pre-incubadas durante 5 minutos a 40°C. A un tiempo = 5 minutos, 1 comprimido de Xylazyme (reticulado, sustrato de xilano teñido, Megazyme, Bray, Irlanda) se añadió a la solución enzimática en un volumen de reacción de 1 ml. A un tiempo = 15 minutos la reacción se terminó añadiendo 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. Los controles se prepararon usando 1000 ml de tampón en vez de solución enzimática. La mezcla de reacción se centrifugó (1500 x g, 10 minutos, 20°C) y la OD del sobrenadante se midió a 590 nm. Una unidad de xilanasa (UX) se define como la actividad de xilanasa incrementando OD₅₉₀ con 0,025 por minuto.
- 20
- 25

El sustrato (arabinoxilano reticulado y teñido, extraído del trigo) usado en el ensayo anterior es una buena aproximación al correspondiente sustrato en aplicaciones comerciales.

- Las enzimas pueden además clasificarse según el manual de Nomenclatura Enzimática de NC-IUBMB, 1992, véase también la página web ENZYME en internet: <http://www.expasy.ch/enzyme/>. ENZYME es un repositorio de información relativo a la nomenclatura de enzimas. Se basa principalmente en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada para la que un número EC (Enzyme Commission) ha sido proporcionado (Bairoch A. "The ENZYME database", 2000, Nucleic Acids Res 28:304-305). Esta nomenclatura de las enzimas IUB-MB se basa en su especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; dicha clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas.
- 30
- 35

- En un aspecto de la invención, la xilanasa es una enzima clasificada como EC 3.2.1.8. El nombre oficial es endo-1,4-beta-xilanasa. El nombre sistemático es 1,4-beta-D-xilan xilanohidrolasa. Otros nombres pueden ser usados, tales como endo-(1-4)-beta-xilanasa; (1-4)-beta-xilan 4-xilanohidrolasa; endo-1 ,4-xilanasa; xilanasa; beta-1 ,4-xilanasa; endo- 1 ,4-xilanasa; endo-beta-1 ,4-xilanasa; endo-1 ,4-beta-D- xilanasa; 1 ,4-beta-xilan xilanohidrolasa; beta-xilanasa; beta-1 ,4-xilan xilanohidrolasa; endo-1 ,4-beta-xilanasa; beta-D-xilanasa. La reacción catalizada es la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.
- 40

- Otra clasificación de ciertas enzimas glucósido hidrolasa, tales como endoglucanasa, xilanasa, galactanasa, mananasa, dextranasa y alfa-galactosidasa, en familias basadas en las similitudes de la secuencia de aminoácidos ha sido propuesta hace algunos años. Normalmente caen en 90 familias diferentes: Véase la página web CAZy(ModO) (Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Servidor Carbohydrate-Active Enzymes en: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> (publicaciones correspondientes: Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering", HJ. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat y B. Svensson eds., The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12; Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) La estructura modular de celulasas y otras enzimas carbohidrato-activas: un enfoque de base de datos integrado. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita y T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23).
- 45
- 50

- En un aspecto de la invención, la xilanasa de la invención es una xilanasa de la Familia 11 de Glucósido Hidrolasa (GH). La expresión "de la Familia 11 de Glucósido Hidrolasa (GH)" significa que la xilanasa en cuestión es o puede clasificarse en la Familia 11 de GH.
- 55

Debe entenderse que las búsquedas de similitud de la proteína (como ProteinBlast en, por ejemplo, http://toolkit.tuebingen.mpg.de/prot_blast) pueden no ser necesariamente determinar si una secuencia desconocida realmente cae bajo la expresión de un miembro de la familia de xilanasas GH11. Las secuencias de proteínas encontradas usando una búsqueda BLAST podrían tener relativamente una alta identidad/homología y todavía no ser xilanasas reales, y además, no ser xilanasas pertenecientes a GH11. De forma alternativa, las secuencias de proteína pueden tener una identidad de secuencia de aminoácidos primaria relativamente baja y ser todavía un miembro de la familia de xilanasas GH11. Para determinar si una secuencia de proteína desconocida es realmente una proteína xilanasas dentro de la familia GH11, la evaluación tendrá que hacerse, no solo en la similitud de secuencia, sino también en la similitud de la estructura 3D, ya que la clasificación dentro de las familias GH se basa en el plegamiento 3D. Un software que predirá el plegamiento 3D de una secuencia de proteína desconocida es HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). El poder de este software para la predicción de la estructura de la proteína se basa en la identificación de secuencias homólogas con la estructura conocida que se usa como modelo. Esto funciona tan bien porque las estructuras divergen mucho más despacio que las secuencias primarias. Las proteínas de la misma familia pueden tener estructuras muy similares incluso cuando sus secuencias han divergido más allá del reconocimiento.

En la práctica, una secuencia desconocida puede pegarse en el software (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) en formato FASTA. Habiendo hecho esto, la búsqueda puede ser enviada. El resultado de la búsqueda mostrará una lista de secuencias con estructuras 3D conocidas. Para confirmar que la secuencia desconocida de hecho es una xilanasas de GH11, las xilanasas de GH11 deberían encontrarse dentro de la lista de homólogos con una probabilidad de >90. No todas las proteínas identificadas como homólogos serán caracterizadas como xilanasas GH11, pero algunas sí. Las últimas proteínas son proteínas con una estructura conocida y una caracterización que las identifica bioquímicamente como xilanasas. Las primeras no han sido caracterizadas bioquímicamente como xilanasas GH11. Varias referencias describen este protocolo, tales como Söding J. (2005) "Protein homology detection by HMM-HMM comparison". *Bioinformatics* 21, 951-960 (doi:10.1093/bioinformatics/bti125) y Söding J, Biegert A, y Lupas AN. (2005) "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction". *Nucleic Acids Research* 33, W244-W248 (Web Server issue) (doi:10.1093/nar/gki40).

De acuerdo con el sitio Cazy(ModO), las glucósido hidrolasas de la Familia 11 pueden caracterizarse como sigue:

Actividades conocidas: xilanasas (EC 3.2.1.8)

Mecanismo: Retención

Nucleófilo/Base catalítico: Glu (experimental)

Donador de protones catalítico: Glu (experimental)

Estado de la estructura 3D: Plegamiento: β -enrollado

Clan: GH-C

Según se usa en este documento, "Clan C" se refiere a agrupaciones de familias que comparten un plegamiento tridimensional común y maquinaria catalítica idéntica (véase, por ejemplo, Henrissat, B. y Bairoch, A., (1996) *Biochem. J.*, 316, 695-696).

Según se usa en este documento, "Familia 11" se refiere a una familia de enzimas como se establece en Henrissat y Bairoch (1993) *Biochem J.*, 293,781-788 (véase, también, Henrissat & Davies (1997) *Current Opinion in Structural Biol.* 1997, &:637-644). Características comunes para los miembros de la familia 11 incluyen una alta homología genética, un tamaño de aproximadamente 20 kDa y un mecanismo catalítico de doble desplazamiento (véase Tenkanen et al., 1992; Wakarchuk et al., 1994). La estructura de las xilanasas de la familia 11 incluye dos grandes β -láminas hechas de β -cadenas y α -hélices.

Las xilanasas de la familia 11 incluyen, pero sin limitación, a los siguientes: XynA de *Aspergillus niger*, XynC de *Aspergillus kawachii*, XynA de *Aspergillus tubigensis*, XynA de *Bacillus circulans*, XynA de *Bacillus pumilus*, XynA de *Bacillus subtilis*, XynA de *Neocallimastix patriciarum*, XynB de *Streptomyces lividans*, XynC de *Streptomyces lividans*, XynII de *Streptomyces thermoviolaceus*, XynA de *Thermomonospora fusca*, Xyn de *Trichoderma harzianum*, XynI de *Trichoderma reesei*, XynII de *Trichoderma reesei*, Xyn de *Trichoderma viride*.

Según se usa en este documento, "tipo salvaje" se refiere a una secuencia o una proteína que es nativa o que se da naturalmente.

En otra realización particular, la xilanasas de la invención se deriva de una xilanasas bacteriana, tal como a partir de una bacteria de (i) el filium de Firmicutas; (ii) la clase de Bacilli; (iii) el orden de Bacillales; (iv) la familia de Paenibacillaceae; o (v) el género de Paenibacillus; tal como a partir de una bacteria de (vi) las especies de *Paenibacillus pabuli*, *Paenibacillus polymyxa* o *Paenibacillus sp.*; tales como de (vii) cepas de *Paenibacillus pabuli* o *Paenibacillus polymyxa*.

La expresión "derivados de xilanasa de una xilanasa bacteriana", según se usa anteriormente en este documento, incluye cualquier xilanasa tipo salvaje aislada a partir de la bacteria en cuestión, así como sus variantes o fragmentos que retienen actividad de xilanasa.

También se describe en este documento una xilanasa derivada de una xilanasa fúngica.

- 5 La definición anterior de "derivado a partir de" (en el contexto de xilanasas bacterianas) es aplicable por analogía también a xilanasas fúngicas.

Ejemplos de xilanasas fúngicas de la glucósido hidrolasa de la familia 11 son aquellas que pueden derivarse del siguiente género fúngico: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Emericella*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Humicola*, *Lentinula*, *Magnaporthe*, *Neocallimastix*, *Nocardiosis*, *Orpinomyces*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pichia*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermomyces*, *Trichoderma*.

Las xilanasas fúngicas incluyen xilanasas fúngicas de levadura y filamentosas. En algunas realizaciones, la xilanasa se deriva de un hongo de (i) el filum de *Ascomycota*; (ii) la clase de *Pezizomycotina*; (iii) el orden de *Eurotiomycetes*; (iv) el sub-orden de *Eurotiales*; (v) la familia de *Trichocomaceae*, tal como el *Trichocomaceae* mitosporico; o a partir de un hongo de (vi) el género *Aspergillus*; tal como a partir de (vii) cepas de *Aspergillus niger*. Se entenderá que la definición de las especies anteriormente mencionadas incluye ambos los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de las especies por el que sean conocidas. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

Las cepas de las bacterias y hongos anteriormente mencionados están fácilmente disponibles para el público en un número de colecciones de cultivo, tal como la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

Las cuestiones que se relacionan con la taxonomía pueden resolverse consultando una base de datos de taxonomía, tal como el Navegador de Taxonomía NCBI que está disponible en el siguiente sitio de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>. Sin embargo, se hace referencia preferiblemente a los siguientes manuales: Dictionary of the Fungi, 9ª edición, editada por Kirk, P.M., P. F. Cannon, J. C. David & J.A. Stalpers, CAB Publishing, 2001; y Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Segunda edición (2005).

La presente invención se refiere a una modificación o modificaciones de una cierta o ciertas posiciones de aminoácidos. Esta posición o posiciones se listan con referencia a la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1. En la presente invención, los polipéptidos con actividad de xilanasa tienen una modificación al menos en la posición 110 comparado con la secuencia de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1. Las posiciones equivalentes en otras xilanasas de la familia 11 pueden encontrarse alineando otras xilanasas de la Familia 11 con SEQ ID No. 1 y determinando qué aminoácidos se alinea con los aminoácidos específicos de SEQ ID No. 1 (por ejemplo, véase el Ejemplo 5). Dicho alineamiento y el uso de una secuencia como primera referencia es simplemente una materia de rutina para un experto ordinario en la técnica.

En un aspecto, una variante de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una mejor solubilización de actividad del salvado que es mayor que la que puede obtenerse mediante el uso de la correspondiente xilanasa tipo salvaje, como se mide en un "ensayo de solubilización de salvado".

En un aspecto, la xilanasa de acuerdo con la invención tiene una mejor solubilización de la actividad del salvado como resultado de la modificación en la posición 110.

De forma adecuada, la actividad solubilizadora del salvado de xilanasa puede medirse usando el ensayo de solubilización de salvado proporcionado en este documento. Por tanto, pueden proporcionarse polipéptidos con mayor actividad de xilanasa y/o mayor actividad solubilizadora del salvado. El requerimiento para la especificidad hacia el WU-AX es cada vez más y más importante, ya que muchas aplicaciones están usando una concentración elevada de salvado de cereal. La industria de fabricación del pan incrementa la concentración de salvado en muchos productos, debido a asuntos de salud y nutricionales y la industria alimenticia incorpora cantidades crecientes de material de salvado (fibra, Destilados de Granos Secos con Agentes Solubles (DDGS)) debido al uso de cereales en la producción de bioetanol, por ejemplo. Es, por tanto, ventajoso proporcionar nuevas xilanasas con mayor especificidad y, por tanto, la eficacia en la solubilización de este material de salvado.

Ensayo de solubilización del salvado

Preferiblemente, la solubilidad del salvado se mide usando the siguiente ensayo.

Una suspensión de salvado de trigo en tampón (0,1 M) hidrógeno-fosfato de di-sodio (0,2 M), pH 5,0 se prepara a una concentración de 1,33% de salvado (p/p). A partir de esta suspensión, se transfieren alícuotas de 750 ml a tubos eppendorph con agitación. Cada tubo de sustrato se pre-calienta durante 5 minutos a 40°C. A partir de ahí, se añaden 250 ml de solución enzimática, haciendo la concentración final del sustrato el 1%. Tres diluciones (por duplicado) se preparan a partir de cada una de las xilanasas, incrementando la concentración enzimática (0,33; 1,0 y

3,0 mg xilanasa/gramos de salvado) en cada tiempo de determinación (0, 30, 60 y 240 minutos). Como control, se usa una solución desnaturalizada por calor de la xilanasa. La reacción se termina a los tiempos dados, transfiriendo los tubos a un incubador ajustado a 95°C. Las muestras desnaturalizadas por calor se mantienen a 4°C hasta que todas las reacciones enzimáticas se terminan. Cuando todas las reacciones enzimáticas se terminan, los tubos Eppendorph se centrifugan para obtener un sobrenadante claro. La capacidad de las enzimas para solubilizar el salvado se expresa como el incremento en reducir los grupos terminales como se determina usando PAHBAH (Lever, 1972).

Ya que las actividades secundarias, tal como la actividad de amilasa, puede interferir con el ensayo anterior, el ensayo de solubilización del salvado debería solo llevarse a cabo en muestras de xilanasa purificada (véase Ex. 2).

En un aspecto, la xilanasa de acuerdo con la invención tiene una menor sensibilidad frente al inhibidor de xilanasa cuando se compara con cualquier xilanasa tipo salvaje.

En un aspecto más, el polipéptido con actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una menor sensibilidad frente al inhibidor de xilanasa como resultado de la modificación en la posición 110 en combinación con una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos: 11, 12, 13, 34, 54, 77, 81, 99, 104, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166 y 175.

El inhibidor puede ser un inhibidor encontrado en la naturaleza en tejidos de plantas.

Según se usa en este documento, la expresión "inhibidor de xilanasa" se refiere a un compuesto, típicamente una proteína, cuyo papel es controlar la despolimerización de carbohidratos complejos, tal como arabinoxilano, encontrados en la pared celular de las plantas. Estos inhibidores de xilanasa son capaces de reducir la actividad de enzimas xilanasas encontradas en la naturaleza así como aquellas de origen fúngico o bacteriano. Aunque la presencia de los inhibidores de xilanasa se ha mostrado en semillas de cereales (véase, por ejemplo, McLauchlan *et al* 1999a; Rouau y Suget 1998).

McLauchlan *et al.* (1999a) describen el aislamiento y la caracterización de una proteína a partir de trigo que se une e inhibe dos xilanasas de la familia-11. De la misma forma, el documento WO 98/49278 muestra el efecto de un extracto de harina de trigo sobre la actividad de un grupo de xilanasas microbianas todas las cuales son clasificadas como xilanasas de la familia 11. Debyser *et al.* (1999) también describen que las endoxilanasas de *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*, que son ambas miembros de las xilanasas de la familia 11, se inhibían por un inhibidor de xilanasa de trigo denominado TAXI. McLauchlan *et al.* (1999b) muestran que los extractos de harinas comerciales tales como de trigo, cebada, centeno y maíz son capaces de inhibir ambas xilanasas de la familia 10 y 11.

El inhibidor de xilanasa puede ser cualquier inhibidor de xilanasa adecuado. De modo ilustrativo, el inhibidor de xilanasa puede ser el inhibidor descrito en el documento WO-A-98/49278 y/o el inhibidor de xilanasa descrito por Rouau, X. y Surget, A. (1998), McLauchlan, R., *et al.* (1999) y/o el inhibidor de xilanasa descrito en los documentos GB19980028599, GB19990007805 y GB19990008645, solicitudes de prioridad del documento WO0039289.

Los inhibidores descritos en la técnica anterior también pueden usarse en ensayos para determinar la sensibilidad de una variante de polipéptido de la invención con inhibidores de xilanasa. También pueden usarse como se describe más abajo para modular la funcionalidad de una xilanasa.

Ensayo del inhibidor de xilanasa

Preferiblemente, la actividad de inhibición de la xilanasa se mide usando el siguiente ensayo.

Se mezclaron 100 µl de la preparación del inhibidor (que contenía varias concentraciones del inhibidor de xilanasa (para la cuantificación, véase la cuantificación del inhibidor de xilanasa más abajo)), 250 µl solución de xilanasa (que contiene 12 UX xilanasa/ml) y 650 µl de tampón (tampón ácido cítrico 0,1 M - hidrógeno-fosfato de di-sodio 0,2 M, BSA al 1% (Sigma-Aldrich, EE.UU.), pH 5,0). La mezcla se termostatóizó durante 5 minutos a 40,0°C. A un tiempo = 5 minutos, se añadió un comprimido de Xylazyme. A un tiempo = 15 minutos la reacción se terminó añadiendo 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. La mezcla de reacción se centrifugó (1500 x g, 10 minutos, 20° C) y el sobrenadante se midió a 590 nm. La inhibición de xilanasa se calculó como actividad residual en %, comparado con el control.

El inhibidor endógeno de endo-β-1,4-xilanasa usado es obtenible de la harina de trigo. El inhibidor es un di-péptido, con un PM de aproximadamente 40 kDa (como se mide por SDS-PAGE o espectrometría de masas) y un pl de aproximadamente 8 a aproximadamente 9,5. El análisis de secuencia hasta la fecha ha revelado que el inhibidor tiene la secuencia presentada como SEQ ID No. 24 o es altamente homólogo con ésta.

Un método para cuantificar la concentración de inhibidor en una preparación dada del inhibidor puede encontrarse en el Ej. 3.

Los controles se prepararon del mismo modo, aunque sustituyendo la solución de inhibidor con agua.

La presente invención también se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención que comprende una secuencia de nucleótidos operativamente unida a una o más secuencias control

que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias control. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser manipulado en una variedad de formas para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de polinucleótidos anterior a su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar las secuencias de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son muy conocidas en la técnica.

La secuencia control puede ser una secuencia promotor apropiada, una secuencia de nucleótidos la cual es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene controles de secuencia transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos con la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos a partir del operón lac de *E. coli*, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de amilasa maltogénico de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, y gen de beta-lactamasa procariótico (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfaamilasa estable ácida de *Aspergillus niger*, awamori glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus* (glaA), lipasa de *Rhizomucor miehei*, alcalina proteasa de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (documento WO 00/56900), proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (documento WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, betaxilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfaamilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y sus promotores mutantes, truncados e híbridos.

En una levadura huésped, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3- fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), tose fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotionina de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

La secuencia control también puede ser una secuencia del terminador de la transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección puede usarse en la presente invención.

Los terminadores para células huésped fúngicas filamentosas pueden obtenerse a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*. Los terminadores para células huésped de levadura pueden obtenerse a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

La secuencia control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un mRNA que sea importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente unida al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección puede usarse en la presente invención.

Secuencias líderes para células huésped fúngicas filamentosas pueden obtenerse a partir de los genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

Las secuencias líderes adecuadas para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

- 5 La secuencia control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir restos de poliadenosina al mRNA transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección puede usarse en la presente invención.

- 10 Las secuencias de poliadenilación para células huésped fúngicas filamentosas pueden obtenerse a partir de los genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa tipo tripsinada *Fusarium oxysporum* y n/geralfa-glucosidasa de *Aspergillus*.

Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

- 15 La secuencia control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos unida al extremo amino de un polipéptido y que dirige al polipéptido codificado dentro de la ruta secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener inherentemente una región codificante del péptido señal unida naturalmente en la traducción del marco de lectura con el segmento de la región codificante que codifica al polipéptido secretado. De forma alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que sea ajeno a la secuencia
20 codificante. La región codificante del péptido señal ajena puede requerirse cuando la secuencia codificante no contenga de forma natural una región codificante del péptido señal. De forma alternativa, la región codificante del péptido señal ajena puede reemplazar simplemente la región codificante del péptido señal natural para potenciar la secreción del polipéptido. Sin embargo, cualquier región codificante del péptido señal que se dirige al polipéptido expresado en la ruta secretora de una célula huésped de elección, es decir, secretada dentro de un medio de cultivo,
25 puede usarse en la presente invención.

- Las señales de la región codificante del péptido eficaces para células huésped bacterianas son las señales de la región codificante del péptido obtenidas a partir de los genes de NCIB 11837 amilasa maltogénica de *Bacillus*, alpha-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y prsA de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal
30 se describen en Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

Las señales de la región codificante del péptido eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las señales de la región codificante del péptido obtenido a partir de los genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

- 35 Los péptidos señal para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes de alfafactor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras señales útiles de la región codificante del péptido se describen en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

- La secuencia control también puede ser una región codificante de propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos posicionada en el extremo amino de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una
40 proenzima o propolipéptido (o un zimógeno, en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede ser convertido en un polipéptido activo y maduro por división catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La región codificante del propéptido puede obtenerse a partir de los genes de alcalina proteasa de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprf), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y laccasa de *Myceliophthora thermophila* (documento WO 95/33836).

- 45 Cuando ambas regiones del péptido señal y del propéptido están presentes en el extremo amino de un polipéptido, la región del propéptido se posiciona próxima al extremo amino de un polipéptido y la región del péptido señal se posiciona próxima al extremo amino de la región del propéptido.

- También puede ser deseable añadir secuencias regulatorias que permitan la regulación de la expresión del polipéptido respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas regulatorios son aquellos que
50 causan la expresión del gen que se activan o desactivan en respuesta a los estímulos químicos o físicos, incluyendo la presencia de un compuesto regulatorio. Los sistemas regulatorios en sistemas procariotas incluyen los sistemas operador lac, tec y tip. En la levadura, puede usarse el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, el promotor de alpha-amilasa de TAKA, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden usarse como secuencias regulatorias. Otros ejemplos de secuencias regulatorias son
55 aquellas que permiten la amplificación de gen. En sistemas eucariotas, estos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneina que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente unida con la secuencia reguladora.

También se describen en este documento vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcionales y de traducción. Los diversos controles de ácidos nucleicos y de la secuencia descritos en este documento pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido a dichos sitios. De forma alternativa, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la presente invención puede expresarse insertando la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácido nucleico que comprende la secuencia en un vector para la expresión apropiado. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante se une operativamente con los controles de la secuencia apropiados para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinantes y puede llevar aproximadamente la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped dentro del cual el vector se va a introducir. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

El vector puede ser autónomamente un vector replicante, es decir, un vector que exista como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la auto-replicación. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce dentro de la célula huésped, se integra dentro del genoma y se replica junto con el cromosoma o los cromosomas dentro de los cuales ha sido integrado. Además, puede usarse un vector simple o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que contengan juntos el ADN total que se introduce dentro del genoma de la célula huésped, o un transposón.

Los vectores descritos en este documento contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permitan la fácil selección de células transformadas, transfectadas, traducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o viral, resistencia frente a metales pesados, prototrofia frente a auxotrofos y similares.

Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como resistencia frente a ampicilina, kanamicina, cloramfenicol o tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero sin limitación, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfinotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como sus equivalentes. En algunas realizaciones los genes de *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* se usan en una célula de *Aspergillus*.

Los vectores descritos en este documento contienen preferiblemente uno o varios elementos que permiten la integración del vector dentro del genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma. Para la integración dentro del genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración dentro del genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. De forma alternativa, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga dentro del genoma de la célula huésped en una precisa localización o localizaciones en el cromosoma o los cromosomas. Para incrementar la probabilidad de integración en una precisa localización, los elementos integracionales deben contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tales como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10.000 pares de bases y lo más preferiblemente de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad con la secuencia diana correspondiente para potenciar la probabilidad de la recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integradores pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse dentro del genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga. Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que le permita al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier plásmido replicador que medie la replicación autónoma que funcione en una célula. La expresión "origen de replicación" o "plásmido replicador" se define en este documento como una secuencia de nucleótidos que permita a un plásmido o a un vector replicarse *in vivo*.

Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB1 10, pE194, pTA1060, y pAMβi que permite la replicación en *Bacillus*.

Ejemplos de orígenes de replicación para uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANSI (Gems *et al.*, 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; documento WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprendan al gen pueden lograrse de acuerdo con los métodos descritos en el documento WO 00/24883.

5 Puede insertarse dentro de la célula huésped más de una copia de un polinucleótido de la presente invención para incrementar la producción del producto génico. Un incremento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido integrando al menos una copia adicional de la secuencia dentro del genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen las copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por ello las copias adicionales del polinucleótido, pueden seleccionarse para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

Los procedimientos usados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son muy conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

15 También se describe en este documento células huésped recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención, que se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención se introduce dentro de una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extra-cromosómico auto-replicante como se describe anteriormente. La expresión "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula parenteral que no sea idéntica a la célula parenteral debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, una célula procariota, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, una célula eucariota. Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tales como bacterias gram positivo incluyendo, pero sin limitación, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, alcalófilos de *Bacillus*, amilolicefaciens de *Bacillus*. *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativo tal como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* En un aspecto, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico. La introducción de un vector dentro de una célula huésped bacteriana puede realizarse, por ejemplo, mediante la transformación del protoplasto (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thome, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278).

También se describe en este documento una célula huésped que puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

Una célula huésped puede ser una célula fúngica. Los "hongos", según se usan en este documento, incluyen los fila *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como se define en Hawksworth *et al.*, En, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como los oomycetos (como se cita en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, pág. 171) y todos los hongos mitoespóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). En otro aspecto, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. La "levadura", según se usa en este documento, incluye la levadura de esporogeneos Asco (Endomicetales), levadura de esporogeneos Basidio y levaduras pertenecientes a *Fungi Imperfecti* (Blastomycetes). Ya que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F. A., Passmore, S. M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

Una célula huésped puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

50 Una célula huésped puede ser una célula de carlsbergensis de *Saccharomyces*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

55 Una célula huésped puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos están generalmente caracterizados por una pared miceliar compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosán, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante elongación hifal y el catabolismo de hidratos de carbono es obligatoriamente aeróbico. En contraste, el crecimiento vegetativo

mediante levaduras, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, es haciendo brotar un talo unicelular y el catabolismo de hidratos de carbono puede ser fermentador.

Una célula huésped puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

Una célula huésped puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*. Las células fúngicas se pueden transformar mediante un procedimiento que implique la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una forma conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238 023 y Yelton et al., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y el documento WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos en Becker y Guarente, En Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivar una célula, que en su forma tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones favorables para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. Preferiblemente, la célula es del género *Aspergillus* y más preferiblemente de *Aspergillus fumigatus*.

La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones favorables para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula puede cultivarse por cultivo en frasco con agitación y fermentación a pequeña escala o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, en lote, en lote alimentado o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido se exprese y/o se aísle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden ser preparados de acuerdo con composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la Colección de Cultivos Tipo Americana). Si el polipéptido se secreta dentro del medio nutritivo, el polipéptido puede ser recuperado directamente a partir del medio. Si el polipéptido no se secreta dentro del medio, puede ser recuperado a partir de lisados de células.

Los polipéptidos pueden ser detectados usando métodos conocidos en la técnica que sean específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático.

Por ejemplo, puede usarse un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este documento.

El polipéptido resultante puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse a partir del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatografía por isofoco y exclusión por tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación por sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción

(véase, por ejemplo, Protein Purification, J. -C. Janson y Lars Ryden, ed., VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

En un aspecto, la modificación de aminoácidos en la posición 110 es una sustitución de aminoácidos.

- 5 En algunas realizaciones, la identidad de secuencia se mide respecto a SEQ ID No. 1, en donde la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 1 comprende además una secuencia del péptido señal, tal como su secuencia del péptido señal natural.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene al menos 90, 92 ó 95% de identidad con SEQ ID No. 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene un plegamiento β -enrollado.

- 10 De acuerdo con la invención, la modificación de aminoácidos en la posición 110 es una sustitución de aminoácidos.

De acuerdo con la invención, la modificación de aminoácidos en la posición 110 es una sustitución en cualquier otro resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: alanina, asparagina, cisteína, ácido glutámico o triptófano.

- 15 En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, la modificación de aminoácidos en la posición 110 es una sustitución en cualquier otro resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: alanina, asparagina, cisteína, ácido glutámico, triptófano.

En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, la modificación de aminoácidos en la posición 110 es una sustitución en cualquier otro resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: ácido glutámico, triptófano, alanina y cisteína.

- 20 En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, la modificación de aminoácidos en la posición 110 es una sustitución en alanina.

- 25 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene un número total de aminoácidos de menos de 250, tal como menos de 240, tal como menos de 230, tal como menos de 220, tal como menos de 210, tal como menos de 200 aminoácidos, tal como en el intervalo de 160 a 240, tal como en el intervalo de 160 a 220 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos: 11, 12, 13, 34, 54, 77, 81, 99, 104, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166 y 175, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 30 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: 11F, 12F, 54Q, 54W, 122D, 113A, 13Y, 113D, 175L, 122F, 34K, 99Y, 104W, 141Q, 154R, 159D, 175K, 81I, 166F, 162E, 162D, 164F, 114D, 114Y, 114F, 118V, 175K, 77L, 77M, 77V, y 77Y, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 35 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: D11F, G12F, N54Q, R122D, Y113A, G13Y, Y113D, N141Q, Q175L, R122F, G34K, K99Y, T104W, K154R, N159D, Q175K, V81I, Y166F, S162E, S162D, W164F, N114D, N114Y, N114F, I118V, I77L, I77M, I77V, y I77Y, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 40 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más modificación o modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159 y 175, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 45 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácidos: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159 y 175, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 50 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende además una o más modificación o modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos: 114 y 166, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende además una o más sustitución o sustituciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácidos: 114 y 166, estando determinada la(s)

posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 5 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en al menos en cuatro de las siguiente posiciones de aminoácidos: 13, 99, 104, 113, 114, 122, 154, 159, 166 y 175, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácidos: 13, 99, 104, 113, 114, 122, 154, 159 y 175, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 10 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácidos: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159, 166 y 175, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácidos: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159, y 175, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 15 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: 13Y, 99Y, 104W, 110A, 113D, 114D, 114F, 122F, 154R, 159D, 166F, 175K, y 175L, estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 20 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos comparado con la secuencia seleccionada entre SEQ ID No. 1 con la que tiene la identidad más alta.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene al menos nueve o diez sustituciones de aminoácidos.
- 25 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en:
 - a. D11F, R122D y T110A;
 - b. D11F, R122D, T110A y Y113A;
 - c. G13Y, T110A, Y113D, R122D y Q175L;
 - 30 d. G13Y, T110A, Y113D, R122F y Q175L;
 - e. G13Y, G34K, T110A, Y113D, R122D y Q175L;
 - f. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175K;
 - g. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D, Q175 y V81I;
 - h. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D, Y166F y Q175L;
 - 35 i. G13Y, T110A, Y113D, R122D, K154R, N159D y Q175L;
 - j. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
 - k. G13Y, T110A, Y113D, R122D, S162E y Q175L;
 - l. G13Y, T110A, Y113D, R122D, S162D y Q175L;
 - m. G13Y, T110A, Y113D, R122D, W164F y Q175L;
 - 40 n. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
 - o. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114Y, R122F, K154R, N159D y Q175L;
 - p. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, K154R, N159D y Q175L;
 - q. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, I118V, R122F, K154R, N159D y Q175L;
 - r. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114Y, R122F, K154R, N159D y Q175K;

- s. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175K;
t. G13Y, I77L, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
u. G13Y, I77M, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
v. G13Y, I77S, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
5 w. G13Y, I77V, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
x. G13Y, I77Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
y. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, N141Q, K154R, N159D, Q175L;
z. G13Y, N54Q, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, N141Q, K154R, N159D, Q175;
aa. G13Y, N54W, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, 141Q, K154R, N159D, 175L;
10 bb. G13Y, N54Q, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, K154R, N159D, Q175L;
cc. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, 141Q, K154R, N159D, Q175L; y
dd. G13Y, 54Q, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, 141Q, K154R, N159D, Q175L;
estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 15 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en:
a. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175K;
b. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D, Y166F y Q175L;
c. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
20 d. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
e. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, K154R, N159D y Q175L;
estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene actividad de solubilización del salvado.
- 25 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención está en forma aislada.
- El término "aislado", según se usa en este documento, significa que el polipéptido está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente con el que la secuencia está naturalmente asociada en la naturaleza.
- En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, la modificación de aminoácidos en la posición 110 no es T110D.
- 30 En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de xilanasa no tiene un ácido aspártico en la posición 110.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene mejor actividad de xilanasa comparado con la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 como se mide en un ensayo de actividad de xilanasa.
- 35 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene mejor actividad de xilanasa como resultado de la modificación en la posición 110.
- El polipéptido de acuerdo con la invención tiene mejor actividad de solubilización del salvado comparado con la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 como se mide en un ensayo de actividad de solubilización del salvado.
- 40 El polipéptido de acuerdo con la invención tiene mejor actividad de solubilización del salvado como resultado de la modificación en la posición 110.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene menor sensibilidad con respecto a un inhibidor de xilanasa.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas a partir de la lista que consiste en:

- a) 13/110/113/122/154/159/175;
- b) 13/99/104/110/113/122/154/159/166/175;
- 5 c) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
- d) 13/110/113/122/175;
- e) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;
- f) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;
- g) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
- 10 h) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
- i) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
- j) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
- k) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
- l) 13/81/99/104/110/113/122/154/159/175;
- 15 m) 13/110/113/122/164/175;
- n) 13/110/113/122/162/175;
- o) 13/110/113/122/175;
- p) 11/122/110/113;
- q) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
- 20 r) 11/122/110;
- s) 13/34/110/113/122/175;
- t) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
- u) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
- v) 13/99/104/110/113/118/122/154/159/175;
- 25 w) 13/110/113/122/162/175;
- x) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
- y) 13/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
- z) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
- aa) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
- 30 bb) 13/54/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
- cc) 13/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175; y
- dd) 13/54/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175;

estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 35 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
- b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;

- c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
 - d) 13Y/110A/113D/122F/175L;
 - e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;
 - 5 g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
 - h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
 - i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
 - j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;
 - k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - 10 l) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - m) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
 - n) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
 - o) 13Y/110A/113D/122D/175L;
 - p) 11F/122D/110A/113A;
 - 15 q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - r) 11F/122D/110A;
 - s) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
 - t) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - u) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - 20 v) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
 - w) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L;
 - x) 13Y/77S/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - z) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - 25 aa) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - bb) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
 - cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; y
 - dd) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - 30 estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;
 - b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;
 - 35 c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 - d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
 - e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;

- f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
5 j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
l) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
m) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;
n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
10 o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
p) D11F/R122D/T110A/Y113A;
q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
r) D11F/R122D/T110A;
s) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
15 t) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
u) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
v) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;
w) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L; y
x) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L
20 y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
z) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
aa) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/175L;
bb) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L; y
25 dd) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos, que consiste en sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:

- a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;
30 c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
d) 13Y/110A/113D/122F/175L;
e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;
g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
35 h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;

- k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
l) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
m) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
n) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
5 o) 13Y/110A/113D/122D/175L;
p) 11F/122D/110A/113A;
q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
r) 11F/122D/110A;
s) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
10 t) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
u) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
v) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
w) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L;
x) 13Y/77S/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
15 y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
z) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
aa) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
bb) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; y
20 dd) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L,
estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, que consiste en sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- 25 a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;
b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;
c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
30 f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
35 k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
l) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
m) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;

- n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
- o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
- p) D11F/R122D/T110A/Y113A;
- q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 5 r) D11F/R122D/T110A;
- s) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
- t) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- u) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- v) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 10 w) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L; y
- x) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L
- y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
- z) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q1 75L;
- aa) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/175 L;
- 15 bb) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q1 75L;
- cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q17 5L; y
- dd) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D /Q175L.

En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención no es SEQ ID No. 25.

- 20 En algunas realizaciones, el polipéptido de acuerdo con la invención no tiene una secuencia seleccionada a partir de la lista que consiste en:

- SEQ ID No. 57 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 62 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 59 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 53 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- 25 SEQ ID No. 65 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 56 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 64 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 52 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 63 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- 30 SEQ ID No. 61 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 60 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 58 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 55 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 12 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- 35 SEQ ID No. 11 de la solicitud de patente internacional WO0238746;
- SEQ ID No. 21 de la solicitud de patente internacional WO0068396; y
- SEQ ID No. 22 de la solicitud de patente internacional WO0068396.

En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se usa para aplicaciones a gran escala.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de a partir de 1 g por litro a aproximadamente 100 g por litro del volumen de cultivo de células total después del cultivo del organismo huésped.

- 5 La presente invención también se refiere a una composición que comprende las secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos que codifican una xilanasa como se describe en este documento.

La composición de la presente invención puede conducir a mejorar el aroma, sabor, suavidad, consistencia, textura, cuerpo, sensación en boca, estabilidad, viscosidad, fractura de gel, estructura y/o propiedades organolépticas y nutrición de productos para el consumo que contiene dicha composición. Además, la composición de la presente invención también puede usarse en combinación con otros componentes de productos para el consumo para impartir dichas mejoras.

Aunque se prefiera que la composición de la presente invención se use para mejorar el aroma, sabor, suavidad, consistencia, textura, cuerpo, sensación en boca, estabilidad, viscosidad, fractura de gel, estructura, suavidad de la superficie y/o propiedades organolépticas y nutrición de productos para el consumo que contiene dicha composición, la presente invención también cubre el uso de la composición de la presente invención como un componente de combinaciones farmacéuticas con otros componentes para suministrar el beneficio médico o fisiológico al consumidor. De acuerdo con esto, la composición de la presente invención puede usarse en combinación con otros componentes.

Ejemplos de otros componentes incluyen uno o más de: agentes espesantes, gelificantes, emulsionantes, aglutinantes, modificadores de cristales, edulcorantes (incluyendo edulcorantes artificiales), modificadores de la reología, estabilizantes, antioxidantes, colorantes, enzimas, vehículos, portadores, excipientes, diluyentes, agentes lubricantes, agentes aromatizantes, colorantes, agentes de suspensión, desintegrantes, aglutinantes de la granulación, etc. Estos otros componentes pueden ser naturales. Estos otros componentes pueden prepararse mediante el uso de técnicas químicas y/o enzimáticas.

Según se usa en este documento, la expresión "agente espesante o gelificante", según se usa en este documento, se refiere a un producto que previene la separación reduciendo o previniendo el movimiento de las partículas, tanto gotitas de líquidos inmiscibles, aire o sólidos insolubles. El espesamiento ocurre cuando las moléculas hidratadas individuales causan un incremento en la viscosidad, retardando la separación. La gelificación ocurre cuando las moléculas hidratadas se unen para formar una red tri-dimensional que atrapa a las partículas, inmovilizándolas mediante esto.

El término "estabilizar", como se usa en este documento, se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que previenen a un producto (por ejemplo, un producto alimenticio) de cambiar a lo largo del tiempo.

El término "emulsionar", según se usa en este documento, se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de un producto alimenticio) que previene la separación de las emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gotas, contenida dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en emulsiones de aceite-en-agua, en las que las gotas o la fase dispersada es aceite y la fase continua es agua; o agua-en-aceite, en la que el agua se vuelve la fase dispersada y la fase continua es aceite. Espumas, que son gases-en-líquidos y suspensiones, que son sólidos-en-líquidos, también pueden estabilizarse a través del uso de emulsionantes. Puede darse la aeración en un sistema tri-fásico donde el aire se quede atrapado por un aceite líquido y luego estabilizarse mediante cristales de grasa aglomerados estabilizados con un emulsionante. Los emulsionantes tienen un grupo polar con una afinidad por el agua (hidrofílico) y un grupo no polar que atrae al aceite (lipofílico). Estos se absorben en las interfases de las dos sustancias, proporcionando una película interfacial que actúa para estabilizar a la emulsión. Las propiedades hidrófilas/lipófilas de los emulsionantes están afectadas por la estructura de la molécula. Estas propiedades se identifican por el valor del balance hidrófilo/lipófilo (BHL). Los valores BHL bajos indican mayores tendencias lipofílicas que se usan para estabilizar las emulsiones de aceite-en-agua. Los valores BHL altos se asignan a emulsionantes hidrofílicos, típicamente usados en emulsiones de aceite-en-agua. Estos valores se derivan de sistemas simples. Debido a que los alimentos a menudo contienen otros ingredientes que afectan a las propiedades emulsionantes, los valores BHL pueden no siempre ser un valor confiable para la selección del emulsionante.

Según se usa en este documento, el término "aglomerante" se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimenticio) que se une al producto conjuntamente a través de una reacción física o química. Durante la "unión", por ejemplo, el agua se absorbe, proporcionando un efecto de unión. Sin embargo, los aglomerantes pueden absorberse en otros líquidos, tales como aceites, manteniéndolos dentro del producto. En el contexto de la presente invención, los aglomerantes se usarían típicamente en productos sólidos o con baja humedad, por ejemplo, productos horneados: pasteles, rosquillas, pan y otros.

La expresión "modificador de cristales", según se usa en este documento, se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimenticio) que afecta a la cristalización tanto de grasa como de agua. La estabilización de cristales de hielo es importante por dos razones. El primero se relaciona directamente con la estabilidad del producto a partir

de una perspectiva de separación. Cuanto más ciclos de congelación/descongelación un producto encuentre, mayor serán los cristales de hielo. Estos grandes cristales pueden romper la estructura del producto, tanto la encontrada en la naturaleza, como en el caso de las paredes celulares, o que se crean por "unión". Dado que el agua ya no se mantiene en su lugar, el producto puede exhibir sinéresis o exudación, después de la descongelación.

- 5 En segundo lugar, en el caso de un producto que se consuma congelado, estos grandes cristales dan lugar a una sensación indeseable, arenosa en la boca.

"Vehículos" o "portadores" significa materiales adecuados para la administración del compuesto e incluyen cualquier dicho material conocido en la técnica tales como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizador o similares, que sean no tóxicos y que no interaccionen con ninguno de los componentes de la composición de una manera perniciosa.

- 10

Ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceites de perfume, monoglicéridos de ácidos grasos y diglicéridos, ésteres de ácidos grasos de petrotral, hidroximetil-celulosa, polivinilpirrolidona y similares.

- 15

Ejemplos de excipientes incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico, glicina, almidón, azúcar de leche y polietilenglicoles de alto peso molecular.

Ejemplos de agentes desintegrantes incluyen uno o más de: almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos.

- 20

Ejemplos de aglomerantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.

Ejemplos de agentes lubricantes incluyen uno o más de: estearato de magnesio, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

- 25 Ejemplos de diluyentes incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina y sus combinaciones.

Pueden usarse otros componentes simultáneamente (por ejemplo, cuando se encuentran en mezcla o incluso cuando se administran por diferentes rutas) o secuencialmente (por ejemplo, pueden administrarse por diferentes rutas).

Según se usa en este documento, la expresión "componentes adecuados para consumo animal o humano" significa un compuesto que es o puede ser añadido a la composición de la presente invención como suplemento que puede aportar un beneficio nutricional, un sustituto de fibra o proporcionar un efecto generalmente beneficioso al consumidor. Los ingredientes pueden usarse en una amplia variedad de productos que requieran la gelificación, texturización, estabilización, suspensión, formación de películas y estructuración, retención de jugosidad, sin aportar una viscosidad innecesaria. Preferiblemente, los ingredientes podrán mejorar la vida útil y estabilidad del cultivo viable.

- 30

De modo ilustrativo, los componentes pueden ser agentes prebióticos tales como alginato, xantano, pectina, goma de algarrobo (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), lactosacarosa, oligosacáridos de semilla de soja, palatinosa, isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos.

La composición de la presente invención puede usarse como - o en la preparación de - un alimento. Aquí, el término "alimento" se usa en un amplio sentido - y cubre alimentos para seres humanos así como alimentos para animales (es decir, una comida). En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano.

- 40

El alimento puede estar en la forma de una solución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Cuando se usa como - o en la preparación de - un alimento - tal como un alimento funcional, la composición de la presente invención puede usarse junto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente activo.

- 45

La composición de la presente invención puede usarse como un ingrediente de alimento.

Según se usa en este documento, la expresión "ingrediente de alimento" incluye una formulación que es o puede ser añadida a alimentos funcionales o comestibles como suplemento nutricional y/o suplemento de fibra. La expresión ingrediente de alimento, como se usa en este documento, también se refiere a formulaciones que pueden usarse a bajos niveles en una amplia variedad de productos que requieren gelificación, texturización, estabilización,

- 50

suspensión, formación de películas y estructuración, retención de jugosidad y mejor sensación al paladar, sin aportarle viscosidad.

El ingrediente del alimento puede estar en forma de una solución o como un sólido – dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

- 5 La composición de la presente invención puede ser - o puede añadirse a – suplementos alimenticios.

La composición de la presente invención puede ser - o puede añadirse a – alimentos funcionales.

Según se usa en este documento, la expresión "alimento funcional" significa un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutritivo y/o una satisfacción gustativa, sino que también sea capaz de suministrar un superior efecto beneficioso al consumidor.

- 10 De acuerdo con esto, los alimentos funcionales son ordinariamente alimentos que tienen componentes o ingredientes (tales como los descritos en este documento) incorporados dentro de estos que imparten al alimento un efecto específico funcional - por ejemplo beneficio médico o fisiológico - diferente a un efecto puramente nutritivo.

Aunque no hay una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes con un interés en este área concuerdan que hay alimentos comercializados que tienen específicos efectos sobre la salud.

- 15 Algunos alimentos funcionales son nutraceuticos. Aquí, la expresión "nutracéutico" significa un alimento que sea capaz de proporcionar no solo un efecto nutritivo y/o una satisfacción gustativa, sino que también sea capaz de suministrar un efecto terapéutico (u otro efecto beneficioso) al consumidor. Los nutraceuticos a través de las líneas de división tradicional entre alimentos y medicina.

- 20 Las encuestas han sugerido que los consumidores ponen el mayor énfasis en las reivindicaciones del alimento funcional relacionado con enfermedades cardiacas. La prevención del cáncer es otro aspecto de la nutrición que interesa a los consumidores mucho, pero sorprendentemente esta es el área que los consumidores piensan que pueden ejercer menos control. De hecho, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, al menos el 35% de los casos de cáncer están relacionados con la dieta. Además, las reivindicaciones que se relacionan con la osteoporosis, salud intestinal y efectos de obesidad son también factores clave que posiblemente van a incitar a la compra del alimento funcional y dirigir el desarrollo del mercado.

- 25 La composición de la presente invención puede usarse en la preparación de productos alimenticios tales como uno o más de: confituras, mermeladas, gelatinas, productos lácteos (tales como leche o queso), productos cárnicos, productos avícolas, productos pesqueros y productos de panadería.

- 30 De modo ilustrativo, la composición de la presente invención puede usarse como ingredientes para refrescos, zumos de frutas o una bebida que comprenda proteína de suero, té saludables, bebidas de coca, bebidas de leche y bebidas de bacterias de ácido láctico, yogurt y yogurt líquido, queso, helados de crema, helados de hielo y postres, repostería, galletas y tortas, aperitivos, cereales para el desayuno, fideos instantáneos y *Cup Noodles*, sopas instantáneas y sopas de taza, alimentos equilibrados y bebidas, endulzantes, bocadillos de mejor textura, barras de fibra, las pastas de relleno estables al horneado, glaseados, relleno de panadería chocolate, relleno de aromatizante de tarta de queso, relleno de aromatizante de tarta de frutas, torta y glaseado de Masanut, relleno de panadería termos-estable, cremas de relleno de panadería instantánea, relleno para galletas, relleno de panadería listo para uso, relleno hipocalórico, bebida nutricional para adultos, bebida de soja/zumo acidificado, bebida de chocolate aséptico/retorta, mezclas de barras, polvos para bebidas, soja/completa suplementada con calcio y leche con chocolate, bebida de café suplementada con calcio.

- 40 Una composición de acuerdo con la presente invención puede usarse además como un ingrediente en productos alimenticios tales como salsa de queso americana, agente con efecto antiaglomerante para queso rallado y desmenuzado, patatas aderezadas, crema de queso, nata ácida sin grasa con aderezo batido mezclado seco, nata montada de leche congelada/descongelada, batidos estables congelados/descongelados, queso Cheddar bajo en grasa y ligero natural, yogurt tipo suizo bajo en grasa, postres congelados aireados y barritas originales, helado envasado, etiquetado fácil, helados envasados más económicos y tolerantes, helado bajo en grasa, helado cremoso, salsa barbacoa, salsa para queso fundido, aderezo de requesón, salsa de Alfredo mezclada en seco, salsa de mezcla de quesos, salsa de tomate mezclada en seco y otros.

- 45 Para ciertos aspectos, preferiblemente el comestible es una bebida.

- 50 Para ciertos aspectos, el comestible es preferiblemente un producto de panadería - tal como el pan, pastelería danesa, galletas o tortas.

La presente invención también proporciona un método para preparar un alimento o un ingrediente del alimento, comprendiendo el método la xilanasa producida mediante el procedimiento de la presente invención o la composición de acuerdo con la presente invención con otro ingrediente del alimento. El método para preparar un ingrediente del alimento es también otro aspecto de la presente invención.

En un sentido general, un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención puede usarse para solubilizar y/o degradar materiales insolubles de la pared celular de las plantas que contienen arabinoxilano, alterar, por ejemplo reducir, la viscosidad derivada de la presencia de hemicelulosa o arabinoxilano en una solución o sistema que comprenda materiales de la pared celular de las plantas. Típicamente, dichos materiales de la pared celular de las plantas comprenderá uno o más inhibidores de xilanasa.

Específicamente, un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención puede usarse en el procesamiento de materiales de plantas para uso como comestibles, tales como alimentación animal, en la producción de almidón, en horneado, en la producción de bio-etanol a partir de material celulósico y en el procesamiento de pulpa de madera para fabricar el papel.

Un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención puede usarse para procesar materiales de plantas tales como cereales que se usan en comestibles incluyendo la alimentación animal. Según se usa en este documento, el término "cereal" significa cualquier tipo de grano usado para alimentos y/o cualquier hierba que produzca este grano tal como, pero sin limitación, cualquiera de trigo, trigo molido, cebada, maíz, sorgo, centeno, avena, triticale y arroz o sus combinaciones. En una realización preferida, el cereal es un cereal de trigo.

El xilano en el alimento y/o el suplemento alimenticio se modifica poniendo en contacto el xilano con el polipéptido con actividad de xilanasa de la presente invención.

Según se usa en este documento, el término "reducir" incluye, aunque sin limitación, pulverización, revestimiento, impregnación o estratificación del alimento y/o del suplemento alimenticio con el polipéptido con actividad de xilanasa de la presente invención.

En una realización, el alimento y/o suplemento alimenticio de la presente invención puede prepararse mezclando el polipéptido con actividad de xilanasa directamente con un alimento y/o suplemento alimenticio. De modo ilustrativo, el polipéptido con actividad de xilanasa puede ponerse en contacto (for ejemplo, por pulverización) en un alimento basado en cereales y/o suplemento alimenticio tal como harina de trigo molida, maíz o soja.

Es también posible incorporar el polipéptido con actividad de xilanasa dentro de un segundo (y diferente) alimento y/o alimento o agua bebible que se añade entonces al alimento y/o suplemento alimenticio de la presente invención. De acuerdo con esto, no es esencial que el polipéptido con actividad de xilanasa proporcionado por la presente invención se incorpore dentro del alimento basado en cereal y/o suplemento alimenticio, aunque dicha incorporación forma un aspecto particularmente preferido de la presente invención.

En una realización de la presente invención, el alimento y/o suplemento alimenticio puede combinarse con otro alimento y/o componentes alimenticios para producir un alimento basado en cereales y/o comida. Dicho otro alimento y/o componentes alimenticios pueden incluir uno o más de otros suplementos de enzimas (preferiblemente termostables), alimento con vitaminas y/o suplementos alimenticios, alimentos minerales y/o suplementos alimenticios y alimentos con aminoácidos y/o suplementos alimenticios. El alimento resultante (combinado) y/o suplemento alimenticio que comprende posiblemente varios diferentes tipos de compuestos pueden entonces mezclarse en una cantidad apropiada con el otro alimento y/o componentes alimenticios tales como suplementos cereales y de proteínas para formar un alimento humano y/o una alimentación animal.

En una realización preferida, el alimento y/o suplemento alimenticio de la presente invención puede prepararse mezclando diferentes enzimas con las actividades apropiadas para producir una mezcla enzimática. De modo ilustrativo, un alimento basado en cereales y/o suplemento alimenticio formado a partir de, por ejemplo, trigo molido o maíz puede ponerse en contacto (por ejemplo, por pulverización) tanto simultáneamente o secuencialmente con la enzima xilanasa y otras enzimas con actividades apropiadas. Estas enzimas pueden incluir, pero sin limitación, a cualquiera de una o más de una amilasa, una glucoamilasa, una mananasa, una galactosidasa, una fitasa, una lipasa, una fosfolipasa, una galactolipasa, una glucanasa, una arabinofuranosidasa, una ferulol esterasa, una pectinasa, una proteasa, una glucosa oxidasa, una hexosa oxidasa y una xilanasa. Enzimas con las actividades deseadas pueden mezclarse por ejemplo con la xilanasa de la presente invención tanto antes de poner en contacto estas enzimas con un alimento basado en cereales y/o suplemento alimenticio o de forma alternativa dichas enzimas pueden ponerse en contacto simultáneamente o secuencialmente en cada suplemento basado en cereales. El alimento y/o suplemento alimenticio entonces se mezcla a su vez con un alimento basado en cereales y/o comida para preparar el alimento final y/o comida. También es posible formular el alimento y/o suplemento alimenticio como una solución de las actividades enzimáticas individuales y luego mezclar esta solución con un alimento y/o material de comida antes de procesar el alimento y/o suplemento alimenticio en peletes o como una mezcla.

La presente invención proporciona el uso de un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención en un procedimiento para preparar un comestible. Los productos de panadería (horneados) típicos de acuerdo con la presente invención incluyen pan - tal como barras, panecillos, bollos, bases de pizza, etc. - rosquillas, tortillas, pasteles, galletitas, galletas, galletas saladas, etc. La preparación de comestibles, tales como productos de panadería es muy conocida en la técnica. La producción en masa, por ejemplo, se describe en el ejemplo 4. El uso de un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención para alterar el comportamiento del horneado se describe en el ejemplo 4.

Un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención también puede usarse en la producción de almidón a partir de materiales de plantas derivados de cereales y tubérculos, tales como patatas.

Un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención también puede usarse en el procesamiento de pulpa de madera, por ejemplo, en la preparación de papel.

5 Procesamiento del material celulósico para la producción de bio-etanol

Un polipéptido con actividad de xilanasa de la invención también puede usarse en la hidrólisis de materiales celulósicos de plantas para la producción de azúcares fermentables en bio-etanol.

10 En algunas realizaciones particulares, el polipéptido con actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una actividad de xilanasa óptima a temperaturas de procesamiento de la masa, tales como en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 40°C. En algunas realizaciones, el polipéptido con actividad de xilanasa de acuerdo con la invención está inactivado durante el procedimiento del horneado.

15 En algunas realizaciones alternativas, el polipéptido con actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene mayor termoestabilidad y/o una temperatura óptima cuando se compara con la enzima tipo salvaje correspondiente que retiene la actividad después del tratamiento con calor. Ambas características son conocidas por los expertos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Mutagénesis dirigida de xilanasas y expresión

20 Se obtuvieron mutantes específicos de xilanasa de *Bacillus subtilis* usando un constructo que comprende el sitio de unión del ribosoma a partir de pET24a (ctagaaataattttgttaacttaagaaggagatatacat) fusionado al gen de xilanasa tipo salvaje sin la secuencia señal (atggctagcacagactactggcaa-----tggtaa) y se transfirieron al vector pCRBlunt (InVitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Esto dio como resultado la expresión constitutiva de xilanasa en células TOP10 (InVitrogen) después de la transformación con el vector construido, a condición que la orientación del gen esté en una dirección "en el sentido de las agujas del reloj". La mutación dirigida en el gen fue entonces obtenida mediante el uso del kit de mutagénesis "QuickChange" (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Los mutantes fueron verificados mediante secuenciación. Una producción suficiente de los mutantes verificados fue obtenida haciendo crecer las células TOP10 transformadas en un volumen de 1 L.

Ejemplo 2 - Estudios de solubilización del salvado de mutantes de xilanasa

Los inventores usaron salvado de trigo como sustrato para evaluar la actividad específica de los variantes de xilanasa ya que este se usa en aplicaciones comerciales.

30 Sustrato de salvado:

35 Como un ejemplo, el salvado podría ser salvado de trigo obtenido a partir de molido en seco de trigo usando un Auto-molino Chopin CD a escala de laboratorio (Chopin Technologies, Francia), usando los parámetros y las condiciones proporcionadas por el proveedor, para moler el trigo dentro de la harina de trigo y el salvado. La fracción de salvado obtenida puede usarse como sustrato en el ensayo de solubilización del salvado. En este Ejemplo, se usó trigo como fuente de cereal.

Ensayo de solubilización del salvado:

40 Una suspensión de salvado de trigo en tampón (0,1 M) - hidrógeno-fosfato de di-sodio (0,2 M), pH 5,0 se prepara a una concentración de salvado del 1,33% (p/p). A partir de esta suspensión, se transfieren alícuotas de 750 ml dentro de tubos Eppendorph con agitación. Cada tubo de sustrato se pre-calienta durante 5 minutos a 40°C. A partir de ahí, se añaden 250 ml de solución enzimática, haciendo la concentración final del sustrato el 1%. Tres diluciones (por duplicado) se preparan a partir de cada una de las xilanasas, incrementando la concentración enzimática (0,33; 1,0 y 3,0 mg xilanasa/gramos de salvado) en cada tiempo de determinación (0, 30, 60 y 240 minutos). Como control, se usa una solución desnaturalizada por calor de la xilanasa. La reacción se termina a los tiempos dados, transfiriendo los tubos a una incubadora ajustada a 95°C. Las muestras desnaturalizadas por calor se mantienen a 4°C hasta que todas las reacciones enzimáticas se terminan. Cuando todas las reacciones enzimáticas se terminan, los tubos Eppendorph se centrifugan para obtener un sobrenadante claro. La capacidad de las enzimas para solubilizar el salvado se expresa como el incremento a OD₄₁₀, determinado mediante el incremento en la reducción de los grupos terminales usando reactivos PAHBAH (Lever, 1972).

50 En breve, la reducción resultante de los grupos terminales se hace reaccionar con PAHBAH formando un producto de reacción coloreado, que puede cuantificarse a un OD de OD₄₁₀.

El ensayo de solubilización del salvado anterior es sensible a la actividad secundaria de enzimas activas en almidón residual en el sustrato de salvado.

Protocolo de purificación de xilanasa de *Bacillus subtilis*:

Células TOP10 de *E. coli* que habían expresado la xilanasa fueron recolectadas mediante centrifugación (20 minutos, 3500 x g, 20° C) y fueron resuspendidas en Tris 50 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4. Las células se abrieron mediante la adición de 1 mg/ml de lisozima (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA, EE.UU., N° cat. 100831), agitando la mezcla durante 2 horas a temperatura ambiente, congelando y descongelando, seguido por sonicación. El pH se ajustó a 4,0 usando HCl 1M seguido de centrifugación (20 minutos, 3500 x g, 20°C). El sobrenadante que contiene la xilanasa se desaló usando columnas de desalado desechables PD-10 (Amersham Bioscience, Suecia) equilibradas y eluidas con acetato de sodio 50 mM, pH 4,5. La muestra desalada se cargó en una columna SOURCE 15S de 10 ml (Amersham Bioscience, Suecia) pre-equilibrada con acetato de sodio 50 mM, pH 4,5. La columna se lavó entonces con tampón de equilibrio y se eluyó con un gradiente de NaCl lineal (acetato de sodio 50 mM, NaCl 0 - 0,35 M, pH 4,5). Las fracciones que contenían actividad de xilanasa fueron reunidas y se usaron para posteriores análisis.

Pueden adaptarse protocolos similares a las variantes de xilanasa derivadas de XynA de otro que *Bacillus subtilis* con un pl significativamente diferente a partir de XynA de *Bacillus subtilis*.

Tabla 1. Actividad de solubilización de salvado de xilanasas expresada como, densidad óptica máxima, el índice de la pendiente de los mutantes de xilanasa, respecto a la densidad óptica y la pendiente comparado con la xilanasa BS1 (la enzima de *Bacillus subtilis* mostrada como SEQ.ID N° 1) y la xilanasa BS3 (la variante de *Bacillus subtilis* mostrada como SEQ.ID N° 23)

Modificaciones hechas a SEQ. ID N° 1	Pendiente OD/h	OD máxima	Pendiente relativa frente a BS1	OD Máx. relativa frente a BS1	Pendiente relativa frente a BS3	OD Máx. relativa frente a BS3
Ninguna (BS1)	0,23	0,69	100	100	140	140
D11F/R122D (BS3)	0,16	0,49	72	72	100	100
D11F/R122D/T110 A	0,25	0,75	110	110	154	154
D11F/R122D/T110 A/Y113A	0,27	0,80	117	117	163	163
G13Y/T110A/Y113 D/R122D/Q175L	0,27	0,82	119	119	167	167
G13Y/T110A/Y113 D/R122F/Q175L	0,37	1,12	164	164	229	229
G13Y/G34K/T110A /Y113D/R122D/Q1 75L	0,25	0,74	108	108	150	150
G13Y/K99Y/T104W /T110A/Y113D/R12 2F/K154R/N159D/ Q175K	0,37	1,11	162	162	226	226
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/ Q175/V81I	0,29	0,87	128	128	178	178
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Y166F/ Q175L	0,39	1,18	172	172	241	241
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/K154R/N159D/ Q175L	0,40	1,19	173	173	242	242

Modificaciones hechas a SEQ. ID N° 1	Pendiente OD/h	OD máxima	Pendiente relativa frente a BS1	OD Máx. relativa frente a BS1	Pendiente relativa frente a BS3	OD Máx. relativa frente a BS3
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/ Q175L	0,37	1,11	162	162	226	226
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162E/Q175L	0,18	0,53	78	78	109	109
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162D/Q175L	0,28	0,83	121	121	169	169
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/W164F/Q175L	0,28	0,83	121	121	169	169
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/ N159D/Q175L	0,34	1,02	149	149	208	208
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	0,35	1,04	152	152	212	212
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114F/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	0,38	1,15	169	169	235	235
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/I118V/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	0,21	0,63	92	92	128	128
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175K	0,33	0,98	144	144	201	201
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/ N159D/Q175K	0,35	1,05	153	153	214	214
G13Y/I77L/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	0,31	0,93	136	136	190	190

Modificaciones hechas a SEQ. ID N° 1	Pendiente OD/h	OD máxima	Pendiente relativa frente a BS1	OD Máx. relativa frente a BS1	Pendiente relativa frente a BS3	OD Máx. relativa frente a BS3
G13Y/I77M/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	0,22	0,67	98	98	137	137
G13Y/I77V/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	0,23	0,69	101	101	141	141
G13Y/I77Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	0,27	0,80	117	117	163	163

Ejemplo 3 – Análisis de la actividad de xilanasa y de la inhibición relativa por inhibidores de xilanasa de cereal

Los mutantes del Ejemplo 2 se analizaron para probar la actividad de xilanasa y la sensibilidad relativa respecto a un inhibidor de xilanasa mediante los protocolos presentados más abajo y de acuerdo con las siguientes indicaciones.

Ensayo de xilanasa (actividad de endo- β -1,4-xilanasa)

- 5 Fueron diluidas muestras en ácido cítrico (0,1 M) - tampón hidrógeno-fosfato de di-sodio (0,2 M), pH 5,0, para obtener aprox. OD₅₉₀ = 0,7 en este ensayo. Tres diluciones diferentes de la muestra se pre-incubaron durante 5 minutos a 40°C. A un tiempo = 5 minutos, 1 comprimido de Xylazyme (reticulado, sustrato de xilano teñido, Megazyme, Bray, Irlanda) se añadió a la solución enzimática en un volumen de reacción de 1 ml. A un tiempo = 15 minutos, la reacción se terminó añadiendo 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. Los controles se prepararon usando 1000 ml de tampón en vez de la solución enzimática. La mezcla de reacción se centrifugó (1500 x g, 10 minutos, 20°C) y la OD del sobrenadante se midió a 590 nm. Una unidad de xilanasa (UX) se define como la actividad de xilanasa incrementando OD₅₉₀ con 0,025 por minuto.

Determinación de la actividad específica:

- 15 La densidad óptica a 280 nm de las muestras purificadas se midió para determinar la concentración de proteína de xilanasa. Se usó una OD₂₈₀ específica, teóricamente calculada, (Gasteiger *et al.*, 2003) de 0,25 unidades/mg x ml para probar el cálculo de la actividad específica de las variantes derivadas de XynA de *Bacillus subtilis*. La actividad de xilanasa fue determinada como se describe anteriormente.

Ensayo del inhibidor de xilanasa

- 20 Se mezcló una preparación del inhibidor de 100 ml (que contenía varias concentraciones de inhibidor de xilanasa (para la cuantificación, véase la cuantificación del inhibidor de xilanasa más abajo)), 250 ml de solución de xilanasa (que contenía 12 UX de xilanasa/ml) y 650 ml de tampón (tampón de ácido cítrico 0,1 M - hidrógeno-fosfato de di-sodio 0,2 M, BSA al 1% (Sigma-Aldrich, EE.UU.), pH 5,0). La mezcla se termostatóizó durante 5 minutos a 40,0°C. A un tiempo = 5 minutos, se añadió un comprimido de Xylazyme (reticulado, sustrato de xilano teñido, Megazyme, Bray, Irlanda). A un tiempo = 15 minutos, la reacción se terminó añadiendo 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. La mezcla de reacción se centrifugó (1500 x g, 10 minutos, 20°C) y el sobrenadante se midió a 590 nm. La inhibición de xilanasa se calculó como actividad residual en %, comparado con el control. Los controles se prepararon del mismo modo, aunque sustituyendo la solución del inhibidor con agua.

Cuantificación del inhibidor de xilanasa:

- 30 1 UX (Unidad de inhibidor de xilanasa) se define como la cantidad de inhibidor que decrece 1 UX de la xilanasa de XynA de *Bacillus subtilis* (Seq ID No 1) a 0,5 UX bajo las condiciones descritas más abajo.

250 ml de solución de xilanasa que contenían 12 UX/ml, aprox. 100 ml de inhibidor de solución de xilanasa y tampón McIlvaine, pH 5, para alcanzar un volumen de reacción de 1000 ml se pre-incuba durante 5 minutos a 40°C. A t = 5 minutos, 1 comprimido de Xylazyme se añade a la mezcla de reacción. A t = 15 minutos, la reacción se termina, mediante la adición de 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. La solución se filtra y la absorbancia del sobrenadante se mide a 590 nm. Mediante la elección de varias concentraciones diferentes de inhibidor en el ensayo anterior, es posible crear una representación de OD versus la concentración de inhibidor. Usando la pendiente (a) y el corte con el eje (b), a partir de esta representación y la concentración de la xilanasa, es posible calcular la cantidad de UX en una solución de inhibidor dada (ecuación 1).

Ecuación 1

$$UIX = ((b/2)/-a)/x$$

10 X = Unidades de xilanasa (UX) en el ensayo

Preparación del inhibidor:

Una preparación cruda del inhibidor (que contenía ambos TAXI y XIP, a partir de aquí en este documento denominada preparación del inhibidor) fue preparada a partir de 1 kg de harina de trigo (*Triticum aestivum*). La preparación del inhibidor fue extraída a partir de la harina usando agua en una proporción 1:3 (p/p) seguido de centrifugación (3500 x g, 20 minutos, 4 °C). El extracto fue mantenido a 65 °C durante 40 minutos, centrifugado (3500 x g, 20 minutos, 4 °C) y desalado usando columnas de desalado PD-10 desechables (Amersham Bioscience, Suecia) pre-equilibradas con tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH 7. La concentración de TAXI en la preparación del inhibidor fue determinada como se describe anteriormente. El protocolo para la purificación y la cuantificación de TAXI se describe en otro lugar (Sibbesen y Sørensen, 2001). Como un ejemplo solamente, el TAXI en la preparación podría ser SEQ ID No. 24 o una secuencia con un 90 % de identidad respecto a ésta.

TABLA 2. Actividad de xilanasa (UX/mg) y sensibilidad del inhibidor de xilanasa de los mutantes indicados como actividad de xilanasa residual a concentraciones crecientes del inhibidor de xilanasa (UIX/ml ensayo).

Modificaciones hechas a SEQ ID No. 1	Actividad Específica UX/mg	% Actividad @ 5,6 UIX/ml	% Actividad @ 33,5 UIX/ml	% Actividad @ 50 UIX/ml
Ninguna (BS1)	23,000	29		
D11F R122D (BS3)	8,400	100	100	95
D11F/R122D/T110A	14,992	98	100	
D11F/R122D/T110A/ Y113A	13,362	99		
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/Q175L	59,571	50		
G13Y/T110A/Y113D/ R122F/Q175L	53,855		65	
G13Y/G34K/T110A/ Y113D/R122D/Q175L	15,876		97	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Q175K	47,975		72	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Q175/ V81I	41,791		46	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Y166F/ Q175L	53,331		68	
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/K154R/N159D/ Q175L	54,924		32	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Q175L	54,811		64	
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162E/Q175L	55,249		44	
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162D/Q175L	52,735		40	

Modificaciones hechas a SEQ ID No. 1	Actividad Específica UX/mg	% Actividad @ 5,6 UIX/ml	% Actividad @ 33,5 UIX/ml	% Actividad @ 50 UIX/ml
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/W164F/Q175L	51,884		29	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	47,445		79	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	46,263		78	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114F/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	42,077		79	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/I118V/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	27,363		79	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175K	35,906		84	
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/N159D/ Q175K	46,939		79	
G13Y/I77L/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	48,177		75	
G13Y/I77M/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	28,412		46	
G13Y/I77S/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	12,003		20	
G13Y/I77V/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	35,907		45	
G13Y/I77Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	33,236		37	

Ejemplo 4 - Comportamiento del horneado de los mutantes

El horneado fue hecho usando a pequeña escala una receta del rollo danés (Tabla 3), usando tanto harina de trigo como harina integral de trigo.

Tabla 3 Receta usada para la producción de pan.

Ingredientes	Mini skala
	ml o g
Harina	50
Levadura seca	1
Sal	0,8
Azúcar	0,8
Agua	400 BU - 2%

Nota: El agua es la absorción de agua @ 400BU determinada por el análisis de harina con farinógrafo (es decir, una consistencia máxima de la masa de 400 – agua añadida de acuerdo con la determinación de la absorción de agua usando un farinógrafo de Brabender, Brabender, Alemania). Si se añaden las enzimas al donut, éstas se añaden como solución líquida y mediante la sustitución de la misma cantidad de agua.

Preparación de la masa y horneado

La harina y los ingredientes secos se mezclaron durante un minuto en un farinógrafo de 50 gramos (Brabender, Duisburg, Alemania); a partir de aquí fue añadida agua y la mezcla fue continuada durante otros cinco minutos.

5 Después de mezclar, se prepararon cuatro grumos de masa, cada uno conteniendo 10 gramos de harina. Estos fueron moldeados dentro de pan usando un moldeador a mano. Los panes fueron puestos dentro de bandejas de horneado y se colocaron en un recipiente sellado (con una tapa) y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. A partir de esto, los panes se probaron a 34°C, 85% de humedad relativa (HR), durante 45 minutos y finalmente se hornearon a 230°C durante cinco minutos en un horno Bago (Bago-line, Fåborg, Dinamarca).

10 Los panes se enfriaron durante 20 minutos antes de la evaluación (peso, medida del volumen, evaluación de la miga y de la corteza).

Tabla 4 Comportamiento del horneado de mutantes – incremento de volumen de pan (ml/g) y volumen relativo comparado con el control (sin enzima añadida) y BS3 (SEQ ID No. 1 con las modificaciones D11F y R122D) que muestran un comportamiento de horneado superior comparado con la xilanasa tipo salvaje de XynA de *Bacillus sub.* (SEQ ID No. 1).

15

Modificaciones hechas a Seq ID No 1	Vol. de pan @ 0,04 mg/kg de harina	Incremento de vol. relativo vs. control, %	Incremento de vol. relativo vs. BS3, %
G13Y/G34K/T110A/ Y113D/R122D/Q175L	4,22	41,89	20
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Q175K	2,90	21,93	7,54
G13Y/V81I/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,80	18,02	4,09
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Y166F/ Q175L	2,82	18,86	4,83
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/K154R/N159D/ Q175L	2,81	18,08	4,15
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Q175L	2,89	21,74	7,24
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162E/Q175L	2,75	13,55	1,99
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162D/Q175L	2,82	15,54	4,48
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/W164F/Q175L	2,78	14,02	3,10
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,81	16,44	4,11
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,73	13,26	1,26
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114F/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,80	16,22	3,74
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/I118V/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,83	17,58	4,95
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175K	2,89	20,65	7,34

Modificaciones hechas a Seq ID No 1	Vol. de pan @ 0,04 mg/kg de harina	Incremento de vol. relativo vs. control, %	Incremento de vol. relativo vs. BS3, %
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/N159D/ Q175K	2,77	14,73	2,63
G13Y/I77L/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,81	15,08	4,32
G13Y/I77M/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,70	12,43	0,17
G13Y/I77S/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,53	5,40	(6,09)
G13Y/I77V/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,60	8,19	(3,63)
G13Y/I77Y/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,73	13,81	1,38

Ejemplo 5 - Efecto de la modificación del resto 110 en la xilanasas de XynA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID NO. 1) o posición equivalente en otras xilanasas de la familia 11.

Xilanasas:

- 5 Las xilanasas mutadas en este ejemplo son la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 1), una variante de la xilanasas de Xyn2 de *Trichoderma reesei* (SEQ ID No. 2) y la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Thermomyces lanuginosus* (SEQ ID No. 3).

- 10 El resto mutado es T110 en la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 1), la posición equivalente, T120, en la xilanasas de *Trichoderma reesei* (SEQ ID No. 2) y la posición equivalente, T120, en la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Thermomyces lanuginosus* (SEQ ID No. 3). Las siguientes mutaciones se prepararon en la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 1): T110H, T110Y, T110S, T110R, T110F, T110Q, T110G, T110K, T110L, T110M, T110I, T110T, T110N, T110E, T110W, T110A y T110C. En ambas xilanasas de *Trichoderma reesei* (SEQ ID No. 2) y xilanasas tipo salvaje de XynA de *Thermomyces lanuginosus* (SEQ ID No. 3) la posición equivalente, T120, fue mutada. Las mutaciones hechas son para los aminoácidos de alanina.

- 15 Las mutaciones, la expresión, la purificación y la determinación de la actividad específica de las xilanasas tipo salvaje o sus variantes se llevan a cabo como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3. Excepto para la purificación de la variante de xilanasas de *Trichoderma reesei*, la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Thermomyces lanuginosus* y su variante T120A; aquí el protocolo de purificación fue modificado para reflejar su pl.

- 20 Tabla 5. Actividad específica determinada como proteína de xilanasas en UX/mg de la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 1), la variante de xilanasas de XynA de *Bacillus subtilis* (T110A), la xilanasas de *Trichoderma reesei* (SEQ ID No. 2), la variante de xilanasas de Xyn2 de *Trichoderma reesei* (T120A), la xilanasas tipo salvaje de XynA de *Thermomyces lanuginosus* (SEQ ID NO. 3) y la variante de xilanasas de XynA de *Thermomyces lanuginosus* (T120A).

Xilanasas	Actividad específica, UX/mg
Xilanasas tipo salvaje de XynA de <i>Bacillus subtilis</i> (SEQ ID No. 1)	23.000
variante de xilanasas de XynA de <i>Bacillus subtilis</i> (T110A)	25874
variante de xilanasas de XynA de <i>Bacillus subtilis</i> (T110N)	23104
variante de xilanasas de XynA de <i>Bacillus subtilis</i> (T110E)	24782
variante de xilanasas de XynA de <i>Bacillus subtilis</i> (T110W)	25478
variante de xilanasas de XynA de <i>Bacillus subtilis</i> (T110C)	26390
xilanasas de <i>Trichoderma reesei</i> (SEQ ID No. 2)	17.500
variante de xilanasas de <i>Trichoderma reesei</i> (T120A)	36797
xilanasas tipo salvaje de XynA de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (SEQ ID No 3)	31.300
variante de xilanasas de XynA de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (T120A)	36066

En todos los casos, la mutación T110A en la xilanasa tipo salvaje de XynA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 1) o la posición equivalente (T120) en la xilanasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID No. 2) o la xilanasa tipo salvaje de XynA de *Thermomyces lanuginosus* (SEQ ID No 3) da como resultado una significativa mayor actividad específica.

5 En la xilanasa tipo salvaje de XynA de *Bacillus subtilis* (SEQ ID No. 1) también las mutaciones T110E, T110N, T110W, y T110C dan como resultado una mayor actividad específica. Aunque la presente invención ha sido descrita en conexión con las realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención como se reivindica no debería ser limitada indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvios para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos relacionados se pretenden que caigan dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

10 Ejemplo 6 - Actividad de variantes de xilanasa en sustrato insoluble en agua *versus* sustrato insoluble.

Se generaron variantes de xilanasa de los BACSU_XynA y TRIRE_Xyn2 usando mutagénesis dirigida de xilanasas y expresión en *E. coli*.

Ensayo para determinar la actividad en sustrato no extraíble con agua, act. de WU-AX (sustrato insoluble):

15 Fueron diluidas muestras en ácido cítrico (0,1 M) - tampón hidrógeno-fosfato de di-sodio (0,2 M), pH 5,0, para obtener aprox. una OD₅₉₀ = 0,7 en este ensayo. Tres diluciones diferentes de la muestra se pre-incubaron durante 5 minutos a 40°C. A un tiempo = 5 minutos, 1 comprimido de Xylazyme (reticulado, sustrato de xilano teñido, Megazyme, Bray, Irlanda) se añadió a la solución enzimática en un volumen de reacción de 1 ml. A un tiempo = 15 minutos, la reacción se terminó añadiendo 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. Los controles se prepararon usando 1000 ml de tampón en vez de solución enzimática. La mezcla de reacción se centrifugó (1500 x g, 10 minutos, 20°C)

20 y la OD del sobrenadante se midió a 590 nm. Una unidad de xilanasa (WU-AX act) se define como la actividad de xilanasa incrementando OD₅₉₀ con 0,025 por minuto.

El sustrato (arabinoxilano extraído del trigo, reticulado y teñido) usado en el ensayo anterior es una buena aproximación al correspondiente sustrato en aplicaciones comerciales.

El siguiente ensayo se usó para determinar la actividad en sustrato extraíble con agua, WE-AX act (sustrato soluble).

25 El método usado es una versión modificada del método descrito por Lever (Lever, M. Analytical Biochemistry, 47, 273-279, 1972). Se usó arabinoxilano de trigo soluble (viscosidad media, obtenible a partir de Megazyme, Bray, Irlanda) como sustrato en un sistema tampón que contenía NaOAc 50 mM, pH 5. La concentración de sustrato fue 0,5%. La actividad de xilanasa se midió cuantificando la formación de extremos reductores usando reactivos PAHBAH. La cantidad de extremos reductores formados y, con ello, la actividad de xilanasa fue determinada a partir

30 de una curva estándar de xilosa. Denominada de aquí en adelante como act. de WE-AX.

Estructuras usadas para desarrollar nuevos variantes:

La Tabla 6 muestra las estructuras variantes de xilanasa usadas. Y5 corresponde a SEQ ID NO. 2.

ID	Variante
#154	BACSU_XynA- G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/ Q175L
#160	BACSU_XynA- G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/ N159D/Q175L
Y5	TRIRE_Xyn2-T2C/T28C/K58R/+191D
Y5-T120A	TRIRE_Xyn2-T2C/T28C/K58R/T120A/+191D

Las mutaciones introducidas y los resultados obtenidos se ilustran en la tabla 7.

Tabla 7 Mutaciones introducidas y resultados obtenidos. Las estructuras usadas están en negrita.

Mutante	act de WU-AX	act de WE-AX	WU-AX/WE-AX
#154/N141Q	1,965	13	146
#154/N54Q/N141Q	1,611	10	159
#160/N54Q	1,203	7	161
#160/N141Q	1,785	10	175
#154/N54W/N141Q	824	7	118
#160/N54W/N141Q	1,005	6	169

Mutante	act de WU-AX	act de WE-AX	WU-AX/WE-AX
Y5/S63W	918	25	36
Y5	35,550	1,487	24
#154	10,350	106	98
#160	5,400	34	157

Listado de secuencia (los aminoácidos en negrita son el aminoácido, el cual corresponde a T110 de SEQ ID No.1):

La secuencia de aminoácidos de la xilanasa tipo salvaje de *Bacillus subtilis* madura (SEQ ID No 1):

ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRT
 INYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTT
 TRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQV
 MA TEGYQSSGSSNVTW

- 5 La secuencia de aminoácidos de la xilanasa madura de *Trichoderma reesei* (SEQ ID No 2), también denominada en este documento Y5:

QCIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVTYCNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKN
 RVINFSGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDGSVYDIY
 RTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVE
 GYFSSGSASITVSD

La secuencia de aminoácidos de la xilanasa madura tipo salvaje de XynA de *Thermomyces lanuginosus* (SEQ ID No. 3):

QTTPNSEGWHGYYYSWWSDGGAQATYTNLEGGTYEISWGDGGNLVGGKGWNPGLNA
 RAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLG
 KTTTRVNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTSGTVQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVA
 TEGYFSSGYARITVADVG

- 10 La secuencia de aminoácidos de la xilanasa madura de *Streptomyces viridosporus* (Seq ID No 4):

WTDAGQTVSMDLGSGGTYSTQWRNTGNFVAGKGWSTGGRKTVNYSGTFNPSGNAYLT
 LYGWTTGPLIEYYIVDNWGTYRPTGKYKGTVTSDGGTYDIYKTTRYNAPSIEGKTFTDQYW
 SVRQSKRTGGTITSGNHFDAWARNGMNLGNHNYMIMATEGYQSSGSSTITV

Seq ID No 5 (gi|139868|sp|P18429.1|XYNA BACSU RecName: Completo=Endo-1,4-beta-xilanasa A; En corto=xilanasa; A; Nombre Alt: Completo=1,4-beta-D-xilan xilanohidrolasa A):

MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNW
SNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYR
PTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNH
VNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW

- 15 Seq ID No 6 (gi|2302074|emb|CAA03092.1| producto proteico no nombrado [no identificado]):

MRQKKLTLLAFLVCFALTLP AEIIQAQIVTDNSIGNH DGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGG
TFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTV DPLV
EYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRT
SGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISND
ESITLDKNN

Seq ID No 7 (gi|167246404|gb|ABZ24364.1| Secuencia 5 de la patente de EE.UU. 7314743):

MVSFTSLLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKRQTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGV TYT
NGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNKVINFSGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIE
YYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDIYRTQRVNQP SIIGTATFYQYWSVRRNHRSS
GSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS

Seq ID No 8 (gi|5969551|gb|AAE10889.1| Secuencia 2 de la patente de EE.UU. 5817500):

MVGFTPVALAALAATGALAFPAGNATELEKRQTTNSEGWH DGYYSWWSDGGAQATYT
NLEGGTYEISWGDGGNLVGGKGWNPGLNARAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEY
YIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLGKTTRVNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTS
GTVQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADVG

5

Seq ID No 9 (gi|76059070|emb|CAJ30753.1| producto proteico no nombrado [*Paenibacillus pabuli*):

MFKFGKKLLTVVLAASMSFGVFAATTGATDYWQNWTDGGGT VNAVNGSGGNYSVNWQ
NTGNFVVGKGW TYGTPNRVVNYNAGVFSPSGNGYLT FYGWTRNALIEYYVDNWGTYRP
TGTYKGTVTSDGGTYDIYTTMRYNQPSIDGYSTFPQYWSVRQSKRPIGVNSQITFQNHVN
AWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSSGSSNVTWV

Seq ID No 10 (gi|74197761|emb|CAJ29666.1| producto proteico no nombrado [*Bacillus halodurans*):

MFKFVTKVLT VVIAATISFCLSAVPASANTYWQYWTDGGGT VNATNGPGGNYSVTWRDT
GNFVVGKGWEIGSPNRTIHYNAGVWEP SGNGYLTLYGWTRNQLIEYYVDNWGTYRPTG
THRGT VVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRQSKRPTGNNVSITFSNHVNA
WRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSGRSNVTWV

10 Seq ID No 11 (gi|4756811|emb|CAB42305.1| producto proteico no nombrado [no identificado]):

MRQKKLTFILAFLVCFALTLP AEIIQAQIVTDNSIGNH DGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGG
TFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTV DPLV
EYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRT
SGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISND
KSITLDKNN

Seq ID No 12 (gi|2293951|emb|CAA02246.1| producto proteico no nombrado [*Bacillus subtilis*] de *Bacillus subtilis*: (documento de EE.UU. 5306633):

MFKFKKKFLVGLTAAFMFSISMFSATASAAGTDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNW
SNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLEIYYVDSWGTYR

PTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTRYNAPSIDGDNTTFTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNH
VNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYKSSGSSNVTW

Seq ID No 13 (gi|42688917|gb|AAS31735.1| Secuencia 14 de la patente de EE.UU. 6682923):

MNLRKLRLLFVMCIGLTLILTAVPAHARTITNNEMGNHSGYDYELWKDYGNTSMTLNNGG
AFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRTHHQLGNISINYNASFNPGGNSYLCVYGWTSPLAE
YYIVDSWGTYRPTGAYKGSFYADGGTYDIYETTRVNQPSIIGIATFKQYWSVRQTKRTSGT
VSVSAHFRKWESLGMPMGKMYETAFTVEGYQSSGSANVMTNQLFIGN

Seq ID No 14 (gi|10040204|emb|CAC07798.1| producto proteico no nombrado [*Penicillium funiculosum*]):

MKLFLAAIVLCATAATAFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYSFWTNGGGEVTY
TNGDNGEYSVTWVDCGFTSGKGWNPANAQTVTYSGEFNPSGNAYLAVYGWTTDPLVE
YYILESYGTYNPSSGLTSLGQVTSDDGGTYDIYSTQRVNQPSTIEGTSTFNQYWSVRTEKRVG
GTVTTANHFAAWKALGLEMGTYNYMIVSTEGYESSGSSTITVS

5

Seq ID No 15 (gi|2302074|emb|CAA03092.1| producto proteico no nombrado [no identificado]):

QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQT
HQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDPPLVEYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVD
GGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRTSGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMY
EVALTVEGYQSSGSANVYSNTLRINGNPLSTISNDESITLDKNN

Seq ID No 16 (gi|167246404|gb|ABZ24364.1| Secuencia 5 de la patente de EE.UU. 7314743):

QTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVTYTNGPGGQFSVNWNSNGNFVGGKGWQPGTKN
KVINFGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDDGSVYDIY
RTQRVNQPSTIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVE
GYFSSGSASITVS

10

Seq ID No 17 (gi|76059070|emb|CAJ30753.1| producto proteico no nombrado [*Paenibacillus pabuli*]):

TDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWQNTGNFVVGKGWTYGTPNRVVNYNAGVF
SPSGNGYLTIFYGWTRNALIEYYVDNWGTYRPTGTYKGTVTSDGGTYDIYTTRYNQPSTI
DGYSTFPQYWSVRQSKRPIGVNSQITFQNHVNAWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSS
GSSNVTW

Seq ID No 18 (gi|74197761|emb|CA329666.1| producto proteico no nombrado [*Bacillus halodurans*]):

NTYWQYWTDGGGTVNATNGPGGNYSVTWRDTGNFVVGKGWEIGSPNRTIHYNAGVWE
PSGNGYLTLYGWTRNQLIEYYVVDNWGTYRPTGTHRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSID
GTQTFQQFWSVRQSKRPTGNNVSITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSG
RSNVTWVW

Seq ID No 19 (gi|4756811|emb|CAB42305.1| producto proteico no nombrado):

QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQT
HQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDPLEYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVD
GGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRTSGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMY
EVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISNDKSITLDKNN

5 Seq ID No 20 (gi|2293951|emb|CAA02246.1| producto proteico no nombrado [*Bacillus subtilis*] de *Bacillus subtilis*: (documento de EE.UU. 5306633));

AGTDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGV
WAPNGNGYLTLYGWTRSPLEYYVVDNWSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPS
IDGDNTTFTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYK
SSGSSNVTWVW

Seq ID No 21 (gi|42688917|gb|AAS31735.1| Secuencia 14 de la patente de EE.UU. 6682923):

RTITNNEMGNHSGDYDELWKDYGNTSMTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRT
HHQLGNISINYNASFNPPGNSYLCVYGWTQSPLAEYYIVDSWGTYRPTGAYKGSFYADGG
TYDIYETTRVNQPSIIGIATFKQYWSVRQTKRTSGTVSVSAHFRKWESLGMMPMGKMYETA
FTVEGYQSSGSANVMTNQLFIGN

Seq ID No 22 (gi|10040204|emb|CAC07798.1| producto proteico no nombrado [*Penicillium funiculosum*]):

AFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYSFWTNGGGEVYTNNGDNGEYSVTWVD
CGDFTSGKGWNPANAOQTVTYSGEFNPSGNAYLAVYGWTTDPLVEYYILES YGTYNPSSGL
TSLGQVTS DGGTYDIYSTQRVNQP SI EGTSTFNQYWSVRTEKRVGGTVTTANHFAAWKA
LGLEMGTYNMIVSTEGYE SSGSSTITVS

10

La SEQ ID No 23 muestra la secuencia de aminoácidos de la variante madura de xilanas de *Bacillus subtilis*, BS3 (tipo salvaje con mutaciones D11F/R122D):

ASTDYWQNWTFGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGV
WAPNGNGYLTLYGWTRSPLEYYVVDNWSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPS
IDGDDTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQ
SSGSSNVTWVW

La Seq ID No 24 muestra la secuencia de la secuencia del inhibidor de xilanas de trigo madura:

MPPVLLLVLAAASLVALPSCQSLPVLAPVTKDPATSLYTI PFHDGASLVLDVAGPLVWSTCDG
GQPPAEIPCSSPTCLLANAYPAPGCPAPSCGSDKHDKPCTAYPYNPVSGACAAGSLSHTRF
VANTTDGSKPVSKVNVGVLAACAPSKLLASLPRGSTGVAGLANSGLALPAQVASAQKVAN
RFLCLPTGGPGVAIFGGGPVPWPQFTQSMPTPLVT KGGSPAHYISARSIVVGDTRVPVP
EGALATGGVMLSTRLPYVLLRPDVYRPLMDAFTKALAAQHANGAPVARAVEAVAPFGVCY
DTKTLGNNLGGYAVPNVQLGLDGGSDWTMTGKNSMVDVKQGTACVAFVEMKGVAAGD
GRAPAVILGGAQMEDFVLD FDM EKRLGFSRLPHFTGCGGL

Seq ID No 25 (secuencia 11 del documento de EE.UU. 6.682.923):

ASTDWWENWTIGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNF DVAKGWTTGSPFRTINYNAGV
WAPNGWGELELYGWTRSPLIEYL VVDSWG TNRPTGT YKGT VKSDGGTYDIYT DTRYNYP
SEDGDRTTMTQYSSVRQSKRPTGSNATITFTNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQDMATEGY
QSSGSSNVTWV

Realizaciones de la invención:

- 5 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene un plegamiento β enrollado.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde la modificación de aminoácido en la posición 110 es una sustitución de aminoácido.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde la modificación de aminoácido en la posición 110 es una sustitución en cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: alanina, asparagina, cisteína, ácido glutámico, triptófano.
- 10 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde la modificación de aminoácido en la posición 110 es una sustitución en cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: ácido glutámico, triptófano, alanina and cisteína.
- 15 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde la modificación de aminoácido en la posición 110 es una sustitución en alanina.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención que tiene un número total de aminoácidos de menos de 250, tal como menos de 240, tal como menos de 230, tal como menos de 220, tal como menos de 210, tal como menos de 200 aminoácidos, tal como en el intervalo de 160 a 240, tal como en el intervalo de 160 a 220 aminoácidos.
- 20 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 11, 12, 13, 34, 54, 77, 81, 99, 104, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166 y 175, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 25 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: 11F, 12F, 54Q, 54W, 122D, 113A, 13Y, 113D, 141Q, 175L, 122F, 34K, 99Y, 104W, 154R, 159D, 175K, 81I, 166F, 162E, 162D, 164F, 114D, 114Y, 114F, 118V, 175K, 77L, 77M, 77V, and 77Y, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 30 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: D11F, G12F, N54Q, R122D, Y113A, G13Y, Y113D, N141Q, Q175L, R122F, G34K, K99Y, T104W, K154R, N159D, Q175K, V81I, Y166F, S162E, S162D, W164F, N114D, N114Y, N114F, I118V, I77L, I77M, I77V, y I77Y, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 35 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159 and 175, estando la(s)

posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 5 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende la(s) sustitución(ones) en las posiciones de aminoácido: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159 and 175, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende además una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 114 y 166, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 10 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende además una o más sustituciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 114 y 166, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 15 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende la(s) sustitución(ones) en al menos en cuatro de las siguientes posiciones de aminoácido: 13, 99, 104, 113, 114, 122, 154, 159, 166, y 175, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende la(s) sustitución(ones) en las posiciones de aminoácido: 13, 99, 104, 113, 114, 122, 154, 159 y 175, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 20 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende la(s) sustitución(ones) en las posiciones de aminoácido: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159, 166 y 175, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende la(s) sustitución(ones) en las posiciones de aminoácido: 13, 99, 104, 113, 122, 154, 159, y 175, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 25 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: 13Y, 99Y, 104W, 110A, 113D, 114D, 114F, 122F, 154R, 159D, 166F, 175K, y 175L, estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 30 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos comparado con la secuencia seleccionada entre SEQ ID No. 1 con la que tiene la identidad más alta.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene al menos nueve o diez sustituciones de aminoácidos.
- 35 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionados a partir del grupo que consiste en:
- a. D11F, R122D y T110A;
 - b. D11F, R122D, T110A y Y113A;
 - c. G13Y, T110A, Y113D, R122D y Q175L;
 - d. G13Y, T110A, Y113D, R122F y Q175L;
 - 40 e. G13Y, G34K, T110A, Y113D, R122D y Q175L;
 - f. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175K;
 - g. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D, Q175 y V81I;
 - h. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D, Y166F y Q175L;
 - i. G13Y, T110A, Y113D, R122D, K154R, N159D y Q175L;
 - 45 j. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
 - k. G13Y, T110A, Y113D, R122D, S162E y Q175L;
 - l. G13Y, T110A, Y113D, R122D, S162D y Q175L;

- m. G13Y, T110A, Y113D, R122D, W164F y Q175L;
- n. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- o. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114Y, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- p. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- 5 q. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, I118V, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- r. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114Y, R122F, K154R, N159D y Q175K;
- s. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175K;
- t. G13Y, I77L, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- u. G13Y, I77M, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- 10 v. G13Y, I77S, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- w. G13Y, I77V, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- x. G13Y, I77Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- y. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, N141Q, K154R, N159D, y Q175L;
- z. G13Y, N54Q, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, N141Q, K154R, N159D, y Q175;
- 15 aa.G13Y, N54W, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, 141Q, K154R, N159D, y 175L;
- bb.G13Y, N54Q, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, K154R, N159D, y Q175L;
- cc. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, 141Q, K154R, N159D, y Q175L;
- dd.G13Y, 54Q, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, 141Q, K154R, N159D, y Q175L;
- 20 estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en:
- a. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175K;
- b. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D, Y166F y Q175L;
- 25 c. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- d. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114D, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- e. G13Y, K99Y, T104W, T110A, Y113D, N114F, R122F, K154R, N159D y Q175L;
- estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 30 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene actividad de solubilización de salvado.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en forma aislada.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde la modificación de aminoácido en la posición 110 no es T110D.
- 35 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención que tiene una mejor actividad de xilanasa comparado con la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 como se mide en un ensayo de actividad de xilanasa.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una mejor actividad de xilanasa como resultado de la modificación en la posición 110.
- 40 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una mejor actividad de solubilización de salvado comparado con la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 como se mide en un ensayo de actividad de solubilización de salvado.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una mejor actividad de solubilización de salvado como resultado de la modificación en la posición 110.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una menor sensibilidad frente al inhibidor de xilanasa.

- 5 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- a) 13/110/113/122/154/159/175;
 - b) 13/99/104/110/113/122/154/159/166/175;
 - c) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - 10 d) 13/110/113/122/175;
 - e) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - f) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - g) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - h) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - 15 i) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - j) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - k) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - l) 13/81/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - m) 13/110/113/122/164/175;
 - 20 n) 13/110/113/122/162/175;
 - o) 13/110/113/122/175;
 - p) 11/122/110/113;
 - q) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - r) 11/122/110;
 - 25 s) 13/34/110/113/122/175;
 - t) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - u) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - v) 13/99/104/110/113/118/122/154/159/175;
 - w) 13/110/113/122/162/175;
 - 30 x) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - y) 13/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
 - z) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
 - aa) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
 - bb) 13/54/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - 35 cc) 13/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175; and
 - dd) 13/54/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175,

estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de la lista que consiste en:

- a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
- b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;
- 5 c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
- d) 13Y/110A/113D/122F/175L;
- e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;
- g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
- 10 h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
- i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
- j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;
- k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- l) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- 15 m) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
- n) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
- o) 13Y/110A/113D/122D/175L;
- p) 11F/122D/110A/113A;
- q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- 20 r) 11F/122D/110A;
- s) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
- t) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- u) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- v) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
- 25 w) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L;
- x) 13Y/77S/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- z) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- aa) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- 30 bb) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
- cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; y
- dd) 13Y/54Q/ 99Y/104W/ 110A/ 113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L;

estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

- 35 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1 que comprende la sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de la lista que consiste en:

a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;

- b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;
- c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
- e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 5 f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- 10 k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- l) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- m) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;
- n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
- o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
- 15 p) D11F/R122D/T110A/Y113A;
- q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- r) D11F/R122D/T110A;
- s) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
- t) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 20 u) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- v) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- w) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L; y
- x) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L
- y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
- 25 z) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
- aa) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/175L;
- bb) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L; y
- dd) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L.
- 30 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos, que consiste en la sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de la lista que consiste en:
 - a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
 - b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;
 - c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
 - 35 d) 13Y/110A/113D/122F/175L;
 - e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;

- g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
 - h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
 - i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
 - j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;
 - 5 k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - l) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - m) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
 - n) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
 - o) 13Y/110A/113D/122D/175L;
 - 10 p) 11F/122D/110A/113A;
 - q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - r) 11F/122D/110A;
 - s) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
 - t) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - 15 u) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - v) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
 - w) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L; y
 - x) 13Y/77S/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L
 - y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - 20 z) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - aa) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - bb) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
 - cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; y
 - dd) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L,
 - 25 estando la(s) posición(ones) determinada(s) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención está en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos of SEQ ID No. 1, que consiste en la sustitución de aminoácidos seleccionada a partir de la lista que consiste en:
- 30 a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;
 - b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;
 - c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 - d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
 - e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 - 35 f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
 - g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
 - h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 - i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;

- j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
 k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 l) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 m) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;
 5 n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
 o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
 p) D11F/R122D/T110A/Y113A;
 q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 r) D11F/R122D/T110A;
 10 s) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
 t) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 u) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 v) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 w) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L; y
 15 x) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L
 y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
 z) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
 aa) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/175L;
 bb) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
 20 cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L; y
 dd) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L.

En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención no es la SEQ ID No. 25.

- 25 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1- 44, comprendiendo dicho método expresar una secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido; y opcionalmente aislar y/o purificar el polipéptido después de la expresión.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención.

Un aspecto se refiere a una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención mezclada con un componente no tóxico.

- 30 Un aspecto se refiere al uso del polipéptido de acuerdo con la invención o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención mezclada con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 52 en un método para modificar materiales de plantas.

Referencias

- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. (2005) FEMS Microbiol Rev., 29 (1), 3-23.
- 35 Courtin, C., Roelants, A. and Delcour, J. (1999). Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47. 1870-1877.
- Coutinho, P.M. and Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- D'Appolonia, B.L. and MacArthur, L.A. (1976). Comparison of bran and endosperm pentosans in immature and mature wheat. Cereal Chem. 53. 711 - 718.
- 40 Debyser, W. and Delcour, J. A. (1998). Inhibitors of cellolytic, xylanolytic and β -glucanolytic enzymes. WO 98/49278.

- Hazlewood, G. P. and Gelbert, H. J. (1993). Recombinant xylanases. PCT application. WO 93/25693.
- Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* 280, 309-316.
- Ingelbrecht, J. A., Verwimp, T. and Delcour, J. A. (1999). Endoxylanases in durum wheat semolina processing: solubilisation of arabinoxylans, action of endogenous inhibitors and effects on rheological properties. *J. Agri. Food Chem.*
- 5 Jacobsen, T. S., Heldt-Hansen, H. P., Kofod, L. V., Bagger, C. and Müllertz, A. (1995). Processing plant material with xylanase. PCT application. WO 95/23514.
- Kormelink, F. J. M. (1992). Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Holland (175 pp., English and Dutch summaries).
- 10 Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry.* 47, 273-279.
- McLauchlan, R., Garcia-Conesa, M. T., Williamson, G., Roza, M., Ravestein, P. and MacGregor, A. W. (1999a). A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochem. J.* 338, 441-446.
- 15 McLauchlan, R., Flatman, R et al (1999) Poster Presentation from meeting at University of Newcastle (1999) April 11th-April 17th. Xylanase inhibitors, a novel class of proteins from cereals.
- Montgomery, R. and Smith, F. (1955). The Carbohydrates of the Gramineae. VIII. The constitution of a water soluble hemicellulose of the endosperm of wheat (*Triticum vulgare*). *J. Am. Chem. Soc.* 77. 3325 - 3328.
- Paice, M.G., Bourbonnais, R., Desrochers, M., Jurasek, L. and Yaguchi, M. (1986): A Xylanase Gene from *Bacillus subtilis*: Nucleotide Sequence and Comparison with *B. pumilus* Gene. *Arch. Microbiol.* 144, 201-206.)
- 20 Rouau, X. (1993). Investigations into the effects of an enzyme preparation from baking on wheat flour dough pentosans. *J. Cereal Science.* 18. 145-157.
- Rouau, X., El-Hayek, M-L. and Moreau, D. (1994). Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flour in relation to changes in pentosan properties. *J. Cereal Science.* 19. 259-272.
- 25 Slade, L., Levine, H., Craig, S., Arciszewski, H. and Saunders, S. (1993). Enzyme treated low moisture content comestible products. US 5200215 by Nabisco.
- Soerensen, J.F. and Sibbesen, O. (1999). Bacterial xylanase. UK A 9828599.2.

Listado de secuencias

- <110> Danisco A/S
- <120> Polipéptidos
- 30 <130> 17482PCT00
- <160> 27
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 185
- 35 <212> PRT
- <213> *Bacillus subtilis*
- <400> 1

ES 2 561 427 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
180 185

<210> 2
<211> 191
5 <212> PRT
<213> Trichoderma reesei
<400> 2

ES 2 561 427 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 194

<212> PRT

5 <213> Thermomyces lanuginosus

<400> 3

ES 2 561 427 T3

Gln Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser
1 5 10 15

Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly
20 25 30

Gly Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly
35 40 45

Lys Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe Glu Gly
50 55 60

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

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

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

Ser Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile
115 120 125

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

Arg Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala Trp Ala
145 150 155 160

Arg Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala
165 170 175

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

Val Gly

<210> 4

<211> 169

<212> PRT

5 <213> Streptomyces viridosporus

<400> 4

ES 2 561 427 T3

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

Thr Tyr Ser Thr Gln Trp Arg Asn Thr Gly Asn Phe Val Ala Gly Lys
20 25 30

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

Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Thr Gly
50 55 60

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

Thr Gly Lys Tyr Lys Gly Thr Val Thr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp
85 90 95

Ile Tyr Lys Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile Glu Gly Thr Lys
100 105 110

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

Thr Ile Thr Ser Gly Asn His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Asn Gly Met
130 135 140

Asn Leu Gly Asn His Asn Tyr Met Ile Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln
145 150 155 160

Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Val
165

<210> 5
<211> 213
<212> PRT
5 <213> Bacillus subtilis
<400> 5

ES 2 561 427 T3

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

Met Ser Ile Ser Leu Phe Ser Ala Thr Ala Ser Ala Ala Ser Thr Asp
20 25 30

Tyr Trp Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Ile Val Asn Ala Val Asn
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Ser Asn Thr Gly Asn Phe
50 55 60

Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Thr Gly Ser Pro Phe Arg Thr Ile Asn
65 70 75 80

Tyr Asn Ala Gly Val Trp Ala Pro Asn Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Leu
85 90 95

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

Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr Tyr Lys Gly Thr Val Lys Ser
115 120 125

Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Thr Arg Tyr Asn Ala Pro
130 135 140

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

Gln Ser Lys Arg Pro Thr Gly Ser Asn Ala Thr Ile Thr Phe Ser Asn
165 170 175

His Val Asn Ala Trp Lys Ser His Gly Met Asn Leu Gly Ser Asn Trp
180 185 190

Ala Tyr Gln Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser
195 200 205

Asn Val Thr Val Trp
210

<210> 6
<211> 248
<212> PRT

ES 2 561 427 T3

<213> Desconocida

<220>

<223> Producto proteico no nombrado

<400> 6

Met	Arg	Gln	Lys	Lys	Leu	Thr	Leu	Ile	Leu	Ala	Phe	Leu	Val	Cys	Phe
1				5					10					15	

Ala	Leu	Thr	Leu	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile	Gln	Ala	Gln	Ile	Val	Thr	Asp
			20					25					30		

Asn	Ser	Ile	Gly	Asn	His	Asp	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Phe	Trp	Lys	Asp
		35					40					45			

Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Met	Ile	Leu	Asn	His	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser
	50					55					60				

Ala	Gln	Trp	Asn	Asn	Val	Asn	Asn	Ile	Leu	Phe	Arg	Lys	Gly	Lys	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

5

ES 2 561 427 T3

65		70		75		80									
Phe	Asn	Glu	Thr	Gln	Thr	His	Gln	Gln	Val	Gly	Asn	Met	Ser	Ile	Asn
				85					90					95	
Tyr	Gly	Ala	Asn	Phe	Gln	Pro	Asn	Gly	Asn	Ala	Tyr	Leu	Cys	Val	Tyr
			100					105					110		
Gly	Trp	Thr	Val	Asp	Pro	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp	Ser	Trp
		115					120					125			
Gly	Asn	Trp	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Lys	Gly	Thr	Ile	Thr	Val
	130					135					140				
Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Leu	Arg	Val	Asn	Gln	Pro
145					150					155				160	
Ser	Ile	Lys	Gly	Ile	Ala	Thr	Phe	Lys	Gln	Tyr	Trp	Ser	Val	Arg	Arg
			165					170					175		
Ser	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ser	Asn	His	Phe	Arg	Ala
		180					185					190			
Trp	Glu	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Met	Gly	Lys	Met	Tyr	Glu	Val	Ala	Leu
	195					200					205				
Thr	Val	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Asn	Val	Tyr	Ser	Asn
	210					215				220					
Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Gly	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr	Ile	Ser	Asn	Asp	Glu
225				230					235					240	
Ser	Ile	Thr	Leu	Asp	Lys	Asn	Asn								
			245												

<210> 7
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Desconocida

5

<220>
 <223> Secuencia 5 de la patente de EE.UU. 7314743
 <400> 7

ES 2 561 427 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Pro Ser Thr Gly Ala Thr Lys Leu Gly Glu Val Thr Ser Asp Gly
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

ES 2 561 427 T3

<210> 8
<211> 225
<212> PRT
<213> Desconocida

5 <220>
<223> Secuencia 2 de la patente de EE.UU. 5817500

<400> 8

Met	Val	Gly	Phe	Thr	Pro	Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu	Ala	Ala	Thr	Gly
1				5				10						15	

Ala	Leu	Ala	Phe	Pro	Ala	Gly	Asn	Ala	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Gln
			20				25						30		

Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser Trp

ES 2 561 427 T3

35	40	45
Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly Gly		
50	55	60
Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys		
65	70	75
Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe Glu Gly Val		
85	90	95
Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg		
100	105	110
Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asp		
115	120	125
Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly Ser		
130	135	140
Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp		
145	150	155
Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys Arg		
165	170	175
Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala Trp Ala Arg		
180	185	190
Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr		
195	200	205
Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp Val		
210	215	220

Gly
225

<210> 9
<211> 210
<212> PRT
<213> Paenibacillus pabuli

5

<400> 9

ES 2 561 427 T3

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

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

Gln Asn Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Val Asn Gly Ser
35 40 45

Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Gln Asn Thr Gly Asn Phe Val Val
50 55 60

Gly Lys Gly Trp Thr Tyr Gly Thr Pro Asn Arg Val Val Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Ala Gly Val Phe Ser Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu Thr Phe Tyr Gly
85 90 95

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

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

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

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

Arg Pro Ile Gly Val Asn Ser Gln Ile Thr Phe Gln Asn His Val Asn
165 170 175

Ala Trp Ala Ser Lys Gly Met Tyr Leu Gly Asn Ser Trp Ser Tyr Gln
180 185 190

Val Met Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr
195 200 205

Val Trp
210

<210> 10
<211> 210
<212> PRT
<213> Bacillus halodurans

ES 2 561 427 T3

<400> 10

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

Ile Ser Phe Cys Leu Ser Ala Val Pro Ala Ser Ala Asn Thr Tyr Trp
20 25 30

Gln Tyr Trp Thr Asp Gly Gly Gly Thr Val Asn Ala Thr Asn Gly Pro
35 40 45

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

Gly Lys Gly Trp Glu Ile Gly Ser Pro Asn Arg Thr Ile His Tyr Asn
65 70 75 80

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

Trp Thr Arg Asn Gln Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val Asp Asn Trp Gly
100 105 110

Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr His Arg Gly Thr Val Val Ser Asp Gly
115 120 125

Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn Ala Pro Ser Ile
130 135 140

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

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

Ala Trp Arg Asn Ala Gly Met Asn Leu Gly Ser Ser Trp Ser Tyr Gln
180 185 190

Val Leu Ala Thr Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Arg Ser Asn Val Thr
195 200 205

Val Trp
210

ES 2 561 427 T3

<210> 11
 <211> 248
 <212> PRT
 <213> Desconocida

5 <220>
 <223> Producto proteico no nombrado

<400> 11
 Met Arg Gln Lys Lys Leu Thr Phe Ile Leu Ala Phe Leu Val Cys Phe
 1 5 10 15
 Ala Leu Thr Leu Pro Ala Glu Ile Ile Gln Ala Gln Ile Val Thr Asp
 20 25 30
 Asn Ser Ile Gly Asn His Asp Gly Tyr Asp Tyr Glu Phe Trp Lys Asp

ES 2 561 427 T3

35	40	45
Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His Gly Gly Thr Phe Ser		
50	55	60
Ala Gln Trp Asn Asn Val Asn Asn Ile Leu Phe Arg Lys Gly Lys Lys		
65	70	75
Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly Asn Met Ser Ile Asn		
	85	90
		95
Tyr Gly Ala Asn Phe Gln Pro Asn Gly Asn Ala Tyr Leu Cys Val Tyr		
	100	105
		110
Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Asp Ser Trp		
	115	120
		125
Gly Asn Trp Arg Pro Pro Gly Ala Thr Pro Lys Gly Thr Ile Thr Val		
	130	135
		140
Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu Arg Val Asn Gln Pro		
145	150	155
		160
Ser Ile Lys Gly Ile Ala Thr Phe Lys Gln Tyr Trp Ser Val Arg Arg		
	165	170
		175
Ser Lys Arg Thr Ser Gly Thr Ile Ser Val Ser Asn His Phe Arg Ala		
	180	185
		190
Trp Glu Asn Leu Gly Met Asn Met Gly Lys Met Tyr Glu Val Ala Leu		
	195	200
		205
Thr Val Glu Gly Tyr Gln Ser Ser Gly Ser Ala Asn Val Tyr Ser Asn		
	210	215
		220
Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr Ile Ser Asn Asp Lys		
225	230	235
		240
Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn		
	245	

<210> 12
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Bacillus subtilis

ES 2 561 427 T3

<400> 12

Met	Phe	Lys	Phe	Lys	Lys	Lys	Phe	Leu	Val	Gly	Leu	Thr	Ala	Ala	Phe
1				5					10					15	
Met	Ser	Ile	Ser	Met	Phe	Ser	Ala	Thr	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp
			20					25					30		
Tyr	Trp	Gln	Asn	Trp	Thr	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr	Val	Asn	Ala	Val	Asn
		35					40					45			
Gly	Ser	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ser	Val	Asn	Trp	Ser	Asn	Thr	Gly	Asn	Phe
	50					55					60				
Val	Val	Gly	Lys	Gly	Trp	Thr	Thr	Gly	Ser	Pro	Phe	Arg	Thr	Ile	Asn
65					70					75					80
Tyr	Asn	Ala	Gly	Val	Trp	Ala	Pro	Asn	Gly	Asn	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu
				85					90					95	
Tyr	Gly	Trp	Thr	Arg	Ser	Pro	Leu	Ile	Glu	Tyr	Tyr	Val	Val	Asp	Ser
			100					105					110		
Trp	Gly	Thr	Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly	Thr	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Lys	Ser
		115					120					125			
Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Thr	Thr	Thr	Arg	Tyr	Asn	Ala	Pro
	130					135					140				
Ser	Ile	Asp	Gly	Asp	Asn	Thr	Thr	Phe	Thr	Gln	Tyr	Trp	Ser	Val	Arg
145					150					155					160
Gln	Ser	Lys	Arg	Pro	Thr	Gly	Ser	Asn	Ala	Ala	Ile	Thr	Phe	Ser	Asn
				165					170					175	
His	Val	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	His	Gly	Met	Asn	Leu	Gly	Ser	Asn	Trp
		180						185					190		
Ala	Tyr	Gln	Val	Leu	Ala	Thr	Glu	Gly	Tyr	Lys	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser
		195					200					205			
Asn	Val	Thr	Val	Trp											
	210														

<210> 13

<211> 228

<212> PRT

<213> Desconocida

<220>

<223> Secuencia 14 de la patente de EE.UU. 6682923

<400> 13

5

Met Asn Leu Arg Lys Leu Arg Leu Leu Phe Val Met Cys Ile Gly Leu

ES 2 561 427 T3

1		5		10		15											
Thr	Leu	Ile	Leu	Thr	Ala	Val	Pro	Ala	His	Ala	Arg	Thr	Ile	Thr	Asn		
			20					25					30				
Asn	Glu	Met	Gly	Asn	His	Ser	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Glu	Leu	Trp	Lys	Asp		
		35					40					45					
Tyr	Gly	Asn	Thr	Ser	Met	Thr	Leu	Asn	Asn	Gly	Gly	Ala	Phe	Ser	Ala		
	50					55					60						
Gly	Trp	Asn	Asn	Ile	Gly	Asn	Ala	Leu	Phe	Arg	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe		
65					70					75					80		
Asp	Ser	Thr	Arg	Thr	His	His	Gln	Leu	Gly	Asn	Ile	Ser	Ile	Asn	Tyr		
				85					90					95			
Asn	Ala	Ser	Phe	Asn	Pro	Gly	Gly	Asn	Ser	Tyr	Leu	Cys	Val	Tyr	Gly		
			100					105					110				
Trp	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ala	Glu	Tyr	Tyr	Ile	Val	Asp	Ser	Trp	Gly		
		115					120					125					
Thr	Tyr	Arg	Pro	Thr	Gly	Ala	Tyr	Lys	Gly	Ser	Phe	Tyr	Ala	Asp	Gly		
	130					135					140						
Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Thr	Arg	Val	Asn	Gln	Pro	Ser	Ile		
145					150					155					160		
Ile	Gly	Ile	Ala	Thr	Phe	Lys	Gln	Tyr	Trp	Ser	Val	Arg	Gln	Thr	Lys		
				165					170					175			
Arg	Thr	Ser	Gly	Thr	Val	Ser	Val	Ser	Ala	His	Phe	Arg	Lys	Trp	Glu		
			180					185					190				
Ser	Leu	Gly	Met	Pro	Met	Gly	Lys	Met	Tyr	Glu	Thr	Ala	Phe	Thr	Val		
		195					200					205					
Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	Asn	Val	Met	Thr	Asn	Gln	Leu		
	210					215					220						
Phe	Ile	Gly	Asn														
225																	

ES 2 561 427 T3

<210> 14
<211> 223
<212> PRT
<213> *Penicillium funiculosum*

5 <400> 14

ES 2 561 427 T3

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

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

Arg Gln Ser Ile Thr Thr Ser Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr
35 40 45

Tyr Ser Phe Trp Thr Asn Gly Gly Gly Glu Val Thr Tyr Thr Asn Gly
50 55 60

Asp Asn Gly Glu Tyr Ser Val Thr Trp Val Asp Cys Gly Asp Phe Thr
65 70 75 80

Ser Gly Lys Gly Trp Asn Pro Ala Asn Ala Gln Thr Val Thr Tyr Ser
85 90 95

Gly Glu Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp
100 105 110

Thr Thr Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Leu Glu Ser Tyr Gly Thr
115 120 125

Tyr Asn Pro Ser Ser Gly Leu Thr Ser Leu Gly Gln Val Thr Ser Asp
130 135 140

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 221

<212> PRT

<213> Desconocida

<220>

<223> Producto proteico no nombrado

5 <400> 15

ES 2 561 427 T3

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

Glu Phe Trp Lys Asp Ser Gly Gly Ser Gly Thr Met Ile Leu Asn His
20 25 30

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

Arg Lys Gly Lys Lys Phe Asn Glu Thr Gln Thr His Gln Gln Val Gly
50 55 60

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

Tyr Leu Cys Val Tyr Gly Trp Thr Val Asp Pro Leu Val Glu Tyr Tyr
85 90 95

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

Gly Thr Ile Thr Val Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Leu
115 120 125

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

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

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

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

Asn Val Tyr Ser Asn Thr Leu Arg Ile Asn Gly Asn Pro Leu Ser Thr
195 200 205

Ile Ser Asn Asp Glu Ser Ile Thr Leu Asp Lys Asn Asn
210 215 220

<210> 16
<211> 190

ES 2 561 427 T3

<212> PRT

<213> Desconocida

<220>

<223> Secuencia 5 de la patente de EE.UU. 7314743

5 <400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 182

<212> PRT

10 <213> Paenibacillus pabuli

ES 2 561 427 T3

<400> 17

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

Val Asn Gly Ser Gly Gly Asn Tyr Ser Val Asn Trp Gln Asn Thr Gly

20

25

30

Asn Phe Val Val Gly Lys Gly Trp Thr Tyr Gly Thr Pro Asn Arg Val
35 40 45

Val Asn Tyr Asn Ala Gly Val Phe Ser Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu
50 55 60

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

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

Thr Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn
100 105 110

Gln Pro Ser Ile Asp Gly Tyr Ser Thr Phe Pro Gln Tyr Trp Ser Val
115 120 125

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

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

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

Ser Asn Val Thr Val Trp
180

210> 18

<211> 182

<212> PRT

<213> Bacillus halodurans

<400> 18

5

ES 2 561 427 T3

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

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

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

Ile His Tyr Asn Ala Gly Val Trp Glu Pro Ser Gly Asn Gly Tyr Leu
50 55 60

Thr Leu Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Gln Leu Ile Glu Tyr Tyr Val Val
65 70 75 80

Asp Asn Trp Gly Thr Tyr Arg Pro Thr Gly Thr His Arg Gly Thr Val
85 90 95

Val Ser Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Thr Thr Met Arg Tyr Asn
100 105 110

Ala Pro Ser Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Gln Gln Phe Trp Ser Val
115 120 125

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

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

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

Ser Asn Val Thr Val Trp
180

<210> 19

<211> 221

<212> PRT

5 <213> Desconocida

<220>

<223> Producto proteico no nombrado

<400> 19

ES 2 561 427 T3

Gln	Ile	Val	Thr	Asp	Asn	Ser	Ile	Gly	Asn	His	Asp	Gly	Tyr	Asp	Tyr	1	5	10	15
Glu	Phe	Trp	Lys	Asp	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Met	Ile	Leu	Asn	His	20	25	30	
Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ala	Gln	Trp	Asn	Asn	Val	Asn	Asn	Ile	Leu	Phe	35	40	45	
Arg	Lys	Gly	Lys	Lys	Phe	Asn	Glu	Thr	Gln	Thr	His	Gln	Gln	Val	Gly	50	55	60	
Asn	Met	Ser	Ile	Asn	Tyr	Gly	Ala	Asn	Phe	Gln	Pro	Asn	Gly	Asn	Ala	65	70	75	80
Tyr	Leu	Cys	Val	Tyr	Gly	Trp	Thr	Val	Asp	Pro	Leu	Val	Glu	Tyr	Tyr	85	90	95	
Ile	Val	Asp	Ser	Trp	Gly	Asn	Trp	Arg	Pro	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Lys	100	105	110	
Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	Thr	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Glu	Thr	Leu	115	120	125	
Arg	Val	Asn	Gln	Pro	Ser	Ile	Lys	Gly	Ile	Ala	Thr	Phe	Lys	Gln	Tyr	130	135	140	
Trp	Ser	Val	Arg	Arg	Ser	Lys	Arg	Thr	Ser	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ser	145	150	155	160
Asn	His	Phe	Arg	Ala	Trp	Glu	Asn	Leu	Gly	Met	Asn	Met	Gly	Lys	Met	165	170	175	
Tyr	Glu	Val	Ala	Leu	Thr	Val	Glu	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ser	Gly	Ser	Ala	180	185	190	
Asn	Val	Tyr	Ser	Asn	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Gly	Asn	Pro	Leu	Ser	Thr	195	200	205	
Ile	Ser	Asn	Asp	Lys	Ser	Ile	Thr	Leu	Asp	Lys	Asn	Asn	210	215	220				

ES 2 561 427 T3

<210> 20
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> *Bacillus subtilis*

5 <400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
 180 185

<210> 21
 <211> 201
 <212> PRT
 <213> Desconocida

10

<220>

ES 2 561 427 T3

<223> Secuencia 14 de la patente de EE.UU. 6682923

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

Phe Tyr Ala Asp Gly Gly Thr Tyr Asp Ile Tyr Glu Thr Thr Arg Val

115

120

125

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

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

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

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

Met Thr Asn Gln Leu Phe Ile Gly Asn
195 200

<210> 22

5 <211> 207

ES 2 561 427 T3

<212> PRT

<213> *Penicillium funiculosum*

<400> 22

Ala Phe Pro Ser Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Gly Asp Leu Ser Lys
1 5 10 15

Arg Gln Ser Ile Thr Thr Ser Gln Thr Gly Thr Asn Asn Gly Tyr Tyr
20 25 30

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

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

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

Gly Glu Phe Asn Pro Ser Gly Asn Ala Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp
85 90 95

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

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

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

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

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

Lys Ala Leu Gly Leu Glu Met Gly Thr Tyr Asn Tyr Met Ile Val Ser
180 185 190

Thr Glu Gly Tyr Glu Ser Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Val Ser
195 200 205

5 <210> 23
<211> 185
<212> PRT

ES 2 561 427 T3

<213> Bacillus subtilis

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
180 185

<210> 24

<211> 402

<212> PRT

<213> Triticum

<400> 24

5

ES 2 561 427 T3

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

Pro Ser Cys Gln Ser Leu Pro Val Leu Ala Pro Val Thr Lys Asp Pro
20 25 30

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

Leu Asp Val Ala Gly Pro Leu Val Trp Ser Thr Cys Asp Gly Gly Gln
50 55 60

Pro Pro Ala Glu Ile Pro Cys Ser Ser Pro Thr Cys Leu Leu Ala Asn
65 70 75 80

Ala Tyr Pro Ala Pro Gly Cys Pro Ala Pro Ser Cys Gly Ser Asp Lys
85 90 95

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

Cys Ala Ala Gly Ser Leu Ser His Thr Arg Phe Val Ala Asn Thr Thr
115 120 125

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

Cys Ala Pro Ser Lys Leu Leu Ala Ser Leu Pro Arg Gly Ser Thr Gly
145 150 155 160

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

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

Gly Pro Gly Val Ala Ile Phe Gly Gly Gly Pro Val Pro Trp Pro Gln
195 200 205

ES 2 561 427 T3

Phe Thr Gln Ser Met Pro Tyr Thr Pro Leu Val Thr Lys Gly Gly Ser
210 215 220

Pro Ala His Tyr Ile Ser Ala Arg Ser Ile Val Val Gly Asp Thr Arg
225 230 235 240

Val Pro Val Pro Glu Gly Ala Leu Ala Thr Gly Gly Val Met Leu Ser
245 250 255

Thr Arg Leu Pro Tyr Val Leu Leu Arg Pro Asp Val Tyr Arg Pro Leu
260 265 270

Met Asp Ala Phe Thr Lys Ala Leu Ala Ala Gln His Ala Asn Gly Ala
275 280 285

Pro Val Ala Arg Ala Val Glu Ala Val Ala Pro Phe Gly Val Cys Tyr
290 295 300

Asp Thr Lys Thr Leu Gly Asn Asn Leu Gly Gly Tyr Ala Val Pro Asn
305 310 315 320

Val Gln Leu Gly Leu Asp Gly Gly Ser Asp Trp Thr Met Thr Gly Lys
325 330 335

Asn Ser Met Val Asp Val Lys Gln Gly Thr Ala Cys Val Ala Phe Val
340 345 350

Glu Met Lys Gly Val Ala Ala Gly Asp Gly Arg Ala Pro Ala Val Ile
355 360 365

Leu Gly Gly Ala Gln Met Glu Asp Phe Val Leu Asp Phe Asp Met Glu
370 375 380

Lys Lys Arg Leu Gly Phe Ser Arg Leu Pro His Phe Thr Gly Cys Gly
385 390 395 400

Gly Leu

<210> 25

<211> 185

<212> PRT

5 <213> Desconocida

<220>

<223> Secuencia 11 del documento de EE.UU. 6.682.923

ES 2 561 427 T3

<400> 25

Ala Ser Thr Asp Trp Trp Glu Asn Trp Thr Ile Gly Gly Gly Ile Val

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Tyr Asn Tyr Pro Ser Glu Asp Gly Asp Arg Thr Thr Met Thr Gln Tyr
115 120 125

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

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

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

Ser Gly Ser Ser Asn Val Thr Val Trp
180 185

<210> 26

<211> 41

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo que comprende el sitio de unión del ribosoma a partir de pET24a

<400> 26

ES 2 561 427 T3

ctagaaataa tttgtttaa cttaagaag gagatataca t 41

<210> 27
<211> 24
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Extremo N-terminal del gen de xilanasa tipo salvaje sin la secuencia señal

<400> 27
10 atggctagca cagactactg gcaa 24

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido con actividad de xilanasa y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos una identidad del 88% con SEQ ID No. 1 y cuyo polipéptido tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 110 con cualquier otro resto de aminoácido diferente seleccionado a partir del grupo que consiste en: asparagina (N), ácido glutámico (E), triptófano (W), alanina (A) y cisteína (C), y una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir del grupo que consiste en: 11F, 12F, 122D, 113A, 13Y, 54Q, 54W, 113D, 141Q, 175L, 122F, 34K, 99Y, 104W, 154R, 159D, 175K, 81I, 166F, 162E, 162D, 164F, 114D, 114Y, 114F, 118V, 175K, 77L, 77M, 77V, y 77Y, estando determinada la(s) posición(ones) como la(s) posición(ones) correspondiente(s) de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1; en donde la variante de xilanasa tiene una mejor actividad de solubilización del salvado, más alta que la que puede obtenerse mediante el uso de la correspondiente xilanasa tipo salvaje de SEQ ID No. 1.
2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido tiene mejor actividad de xilanasa cuando se compara con SEQ ID NO:1.
3. El polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, en donde dicho polipéptido tiene al menos 90, 92 ó 95% de identidad con SEQ ID No. 1.
4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene un plegamiento β -enrollado.
5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la modificación de aminoácidos en la posición 110 es una sustitución en alanina.
6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que tiene un número total de aminoácidos de menos de 250, tal como menos de 240, tal como menos de 230, tal como menos de 220, tal como menos de 210, tal como menos de 200 aminoácidos, tal como en el intervalo de 160 a 240, tal como en el intervalo de 160 a 220 aminoácidos.
7. Un método para preparar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1- 6, comprendiendo dicho método expresar una secuencia de nucleótidos que codifica a dicho polipéptido; y opcionalmente aislar y/o purificar el polipéptido después de la expresión.
8. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un polipéptido preparado de acuerdo con la reivindicación 7 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8 en mezcla con un componente no tóxico.
10. El uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un polipéptido preparado de acuerdo con la reivindicación 7 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 en un método para modificar materiales de plantas.

Figura 1



Figura 2

		1	60
1	(1)	-----ASTDYWQNWTDGGGIVN	
10	(1)	-----MFKFVTKVLTVVIAATISFCLSAVPAS--ANTYWQYWTDGGGTVN	
18	(1)	-----NTYWQYWTDGGGTVN	
11	(1)	-----MRQKKLTFLAFLVCFALTLPAEIIQAQIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
6	(1)	-----MRQKKLTLILAFLVCFALTLPAEIIQAQIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
15	(1)	-----QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
19	(1)	-----QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
13	(1)	-----MNLRLKRLLFVMCIGLTLILTAVPAHARTITNNEMGNHSGDYELWKDYG-NTS	
21	(1)	-----RTITNNEMGNHSGDYELWKDYG-NTS	
14	(1)	MKLFLAAIVLCATAATAFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYSFWTNGGGEVT	
22	(1)	-----AFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYSFWTNGGGEVT	
16	(1)	-----Q-TIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVT	
7	(1)	-MVSFTSLLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKRQ-TIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVT	
2	(1)	-----Q-CIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVT	
3	(1)	-----Q-TTPNSEGWHDGYYSWWSGDGAQAT	
8	(1)	--MVGFTPVALAALAATGALAFPAGNATELEKRQ-TTPNSEGWHDGYYSWWSGDGAQAT	
4	(1)	-----WTDAGQTVS	
17	(1)	-----TDYWQNWTDGGGTVN	
9	(1)	-----MFKFGKKLLTVVLAASMSFGVFAATT--GATDYWQNWTDGGGTVN	
12	(1)	-----MFKFKKKFLVGLTAAFMSSISMFSATASAAGTDYWQNWTDGGGTVN	
20	(1)	-----AGTDYWQNWTDGGGTVN	
5	(1)	-----MFKFKKNFLVGLSALMSISLFSATASAASTDYWQNWTDGGGIVN	
		61	120
1	(18)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
10	(44)	ATNGPGGNYSVTWRDGTGNFVVGKG-----WEIGSPNRTIHYNAGVWEPGNGYLTLYG	
18	(16)	ATNGPGGNYSVTWRDGTGNFVVGKG-----WEIGSPNRTIHYNAGVWEPGNGYLTLYG	
11	(55)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
6	(55)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
15	(28)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
19	(28)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
13	(54)	MTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRTHQLGNISINYNASFN-PGGNSYLCVYG	
21	(27)	MTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRTHQLGNISINYNASFN-PGGNSYLCVYG	
14	(61)	YTNGDNGEYSVTWVDCGDFTSKGK-----WNP-ANAQTVTYSGEFN-PSGNAYLAVYG	
22	(45)	YTNGDNGEYSVTWVDCGDFTSKGK-----WNP-ANAQTVTYSGEFN-PSGNAYLAVYG	
16	(27)	YTNGPGGQFSVNWSNSGNFVVGKG-----WQPGTKNKVINFSGSYN-PNGNSYLSVYG	
7	(59)	YTNGPGGQFSVNWSNSGNFVVGKG-----WQPGTKNKVINFSGSYN-PNGNSYLSVYG	
2	(27)	YCNGPGGQFSVNWSNSGNFVVGKG-----WQPGTKNRVINFSGSYN-PNGNSYLSVYG	
3	(27)	YTNLEGGTYEISWGDGGNLVGGKG-----WNPGLNARAIHFEGVYQ-PNGNSYLAIVYG	
8	(58)	YTNLEGGTYEISWGDGGNLVGGKG-----WNPGLNARAIHFEGVYQ-PNGNSYLAIVYG	
4	(10)	MDLGSGGTYSTQWRNTGNFVAGKG-----WSTGG-RKTVNY-SGTENPSGNAYLTLYG	
17	(16)	AVNGSGGNYSVNWQNTGNFVVGKG-----WTYGTPNRVVNYNAGVFSPSGNGYLTLYG	
9	(44)	AVNGSGGNYSVNWQNTGNFVVGKG-----WTYGTPNRVVNYNAGVFSPSGNGYLTLYG	
12	(46)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
20	(18)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
5	(46)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
		121	180
1	(71)	WTRSPLEIYYVVDWSWGTYPRTG--TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQY	
10	(97)	WTRNQLIEYYVVDNWGTYPRTG--THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDG-TQTFQQF	
18	(69)	WTRNQLIEYYVVDNWGTYPRTG--THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDG-TQTFQQF	
11	(114)	WTVDPLEVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
6	(114)	WTVDPLEVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
15	(87)	WTVDPLEVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
19	(87)	WTVDPLEVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
13	(113)	WTQSPLAEYYIVDSWGTYPRTG-AY-KGSFYADGGTYDIYETTRVNQPSIIG-IATFKQY	
21	(86)	WTQSPLAEYYIVDSWGTYPRTG-AY-KGSFYADGGTYDIYETTRVNQPSIIG-IATFKQY	
14	(112)	WTTDPLVEYYIILESYGTYNPSSGLTSLGQVTSDDGGTYDIYSTQVRVNQPSIEG-TSTFNQY	
22	(96)	WTTDPLVEYYIILESYGTYNPSSGLTSLGQVTSDDGGTYDIYSTQVRVNQPSIEG-TSTFNQY	

16 (79) WSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSIIG-TATFYQY
7 (111) WSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSIIG-TATFYQY
2 (79) WSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSIIG-TATFYQY
3 (79) WTRNPLVEYYIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLGKTTRVNAPSIDG-TQTFDQY
8 (110) WTRNPLVEYYIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLGKTTRVNAPSIDG-TQTFDQY
4 (61) WTTGPLIEYYIVDNWGTYPRTG--KYKGTVTSDDGGTYDIYKTTRYNAPSIEG-TKTFDQY
17 (69) WTRNALIEYYVVDNWGTYPRTG--TYKGTVTSDDGGTYDIYTTMRYNQPSIDG-YSTFPQY
9 (97) WTRNALIEYYVVDNWGTYPRTG--TYKGTVTSDDGGTYDIYTTMRYNQPSIDG-YSTFPQY
12 (99) WTRSPLEYYVVDWGTYPRTG--TYKGTVKSDDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDNTTFTQY
20 (71) WTRSPLEYYVVDWGTYPRTG--TYKGTVKSDDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDNTTFTQY
5 (99) WTRSPLEYYVVDWGTYPRTG--TYKGTVKSDDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQY
181 240
1 (129) WSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW---
10 (154) WSVRQSKRPTGNNVSI TFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSGRSNVTW---
18 (126) WSVRQSKRPTGNNVSI TFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSGRSNVTW---
11 (172) WSVRRSKR---TSGTISVSNHFRAWENLGMNMG-KMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTLR
6 (172) WSVRRSKR---TSGTISVSNHFRAWENLGMNMG-KMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTLR
15 (145) WSVRRSKR---TSGTISVSNHFRAWENLGMNMG-KMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTLR
19 (145) WSVRRSKR---TSGTISVSNHFRAWENLGMNMG-KMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTLR
13 (170) WSVRQTKR---TSGTVSVSAHFRKWESLGMMPG-KMYETAFTVEGYQSSGSANVMTNQLF
21 (143) WSVRQTKR---TSGTVSVSAHFRKWESLGMMPG-KMYETAFTVEGYQSSGSANVMTNQLF
14 (171) WSVRTEKR---VGGTVTTANHF AAWKALGLEMG-TYNYMIVSTEGYESSGSSTITVS---
22 (155) WSVRTEKR---VGGTVTTANHF AAWKALGLEMG-TYNYMIVSTEGYESSGSSTITVS---
16 (138) WSVRRNHR---SSGSVNTANHFNAWAQQGLTLG-TMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS---
7 (170) WSVRRNHR---SSGSVNTANHFNAWAQQGLTLG-TMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS---
2 (138) WSVRRNHR---SSGSVNTANHFNAWAQQGLTLG-TMDYQIVAVEGYFSSGSASITVSD--
3 (138) WSVRQDKR---TSGTVQTCGFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADVG
8 (169) WSVRQDKR---TSGTVQTCGFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADVG
4 (118) WSVRQSKR---TGGTITSGNHFDWARNGMNLG-NHNYMIMATEGYQSSGSSTITV---
17 (126) WSVRQSKRPIGVNSQITFQNHVNAWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSSGSSNVTW---
9 (154) WSVRQSKRPIGVNSQITFQNHVNAWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSSGSSNVTW---
12 (157) WSVRQSKRPTGSNAAITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYKSSGSSNVTW---
20 (129) WSVRQSKRPTGSNAAITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYKSSGSSNVTW---
5 (157) WSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW---

	241	261
1	(186) -----	
10	(211) -----	
18	(183) -----	
11	(228) INGNPLSTISNDKSITL DKNN	
6	(228) INGNPLSTISNDESITL DKNN	
15	(201) INGNPLSTISNDESITL DKNN	
19	(201) INGNPLSTISNDKSITL DKNN	
13	(226) IGN-----	
21	(199) IGN-----	
14	(224) -----	
22	(208) -----	
16	(191) -----	
7	(223) -----	
2	(192) -----	
3	(195) -----	
8	(226) -----	
4	(170) -----	
17	(183) -----	
9	(211) -----	
12	(214) -----	
20	(186) -----	
5	(214) -----	