

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 983 563**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/24** (2006.01)  
**C12P 19/14** (2006.01)  
**C12C 7/04** (2006.01)  
**C12C 5/00** (2006.01)  
**C12C 11/00** (2006.01)  
**A61P 1/14** (2006.01)  
**A23K 20/189** (2006.01)  
**A23K 10/38** (2006.01)  
**A23K 10/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015** **E 20165858 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024** **EP 3702450**

54 Título: **Proteína**

30 Prioridad:

**31.01.2014 GB 201401648**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**23.10.2024**

73 Titular/es:

**INTERNATIONAL N&H DENMARK APS (100.0%)**  
**Parallelvej 16**  
**2800 Kongens Lyngby, DK**

72 Inventor/es:

**LORENTSEN, RIKKE HOEEGH;**  
**ARENT LUND, SUSAN;**  
**NIKOLAEV, IGOR;**  
**KOOPS, BART y**  
**HENDRIK A VAN TUIJL, JAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la  
Oficina Europea de Patentes

ES 2 983 563 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

Proteína

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a nuevas xilanasas que son termoestables, y al uso de dichas xilanasas en aplicaciones, que incluyen aplicaciones en alimentos para animales, en la elaboración de cerveza o malta, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilano, como los materiales a base de grano, por ejemplo en la producción de biocombustibles u otros productos de fermentación, incluyendo compuestos bioquímicos (por ejemplo, con base biológica de isopreno), y/o en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, y a métodos de uso de estas xilanasas, así como a composiciones (tales como composiciones de aditivos para piensos) que comprenden dichas xilanasas.

## 15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Durante muchos años, las endo-p-1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (denominadas xilanasas aquí) se han utilizado para la modificación de hidratos de carbono complejos derivados del material de la pared celular de las plantas. Es bien conocido en la técnica que la funcionalidad de distintas xilanasas (derivadas de microorganismos o plantas diferentes) difiere enormemente. Xilanasa es el nombre dado a una clase de enzimas que degradan el polisacárido lineal beta-1,4-xilano a xilooligosacáridos o xilosa, descomponiendo así la hemicelulosa, uno de los componentes principales de las paredes celulares de las plantas.

En función de la información estructural y genética, las xilanasas se han clasificado en distintas familias de glicósido hidrolasas (GH) (Henrissat, (1991) Biochem. J. 280, 309-316).

Inicialmente, todas las xilanasas conocidas y caracterizadas pertenecían a las familias GH10 o GH11. Después, otros trabajos identificaron muchos otros tipos de xilanasas que pertenecen a las familias GH5, GH7, GH8 y GH43 (Collins et al (2005) FEMS Microbiol Rev., 29 (1), 3-23).

Hasta ahora, la familia GH11 difiere de todas las demás GH, ya que es la única familia que consiste solamente en xilanasas específicas de xilano. La estructura de las xilanasas GH11 puede describirse como una estructura de barril  $\beta$  tipo remolino o una estructura plegada en sándwich de todas las hebras  $\beta$  (Himmel et al 1997 Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65, 315-325). Las enzimas GH11 tienen un dominio catalítico de aproximadamente 20 kDa.

Las xilanasas GH10 tienen un dominio catalítico con pesos moleculares en el intervalo de 32-39 kDa. La estructura del dominio catalítico de las xilanasas GH10 consiste en un barril  $\beta/\alpha$  de 8 pliegues (Harris et al 1996 - Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

Las estructuras tridimensionales están disponibles para un gran número de enzimas de la familia GH10, siendo las primeras resueltas las de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (Derewenda et al, J Biol Chem, 19 de agosto de 1994; 269(33) 20811-4), la endoglucanasa Cex de *C. fimi* (White et al Biochemistry, 25 de octubre de 1994; 33(42) 12546-52), y Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (anteriormente *Pseudomonas fluorescens* subesp. xilanasas A) (Harris et al Structure, 15 de noviembre de 1994; 2(11) 1107-16). Como miembros del Clan GHA, tienen un plegamiento de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> clásico, con los dos ácidos glutámicos clave del sitio activo ubicados en los extremos C-terminal de las hebras beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat et al, Proc Natl Acad Sci U S A, 1995 julio 18; 92(15) 7090-4).

Se han realizado estudios integrales que caracterizan la funcionalidad de las xilanasas en sustratos puros y bien caracterizados (Kormelink et al., 1992 Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Tesis de doctorado, Agricultural University Wageningen, Holanda (175 pág., resúmenes en inglés y alemán)). Estos estudios muestran que distintas xilanasas tienen requisitos específicos diferentes con respecto a la sustitución del esqueleto de xilosa del arabinoxilano (AX). Algunas xilanasas requieren tres restos de xilosa no sustituidos para hidrolizar el esqueleto de xilosa; otros requieren sólo uno o dos. Se cree que las razones para estas diferencias en la especificidad se deben a la estructura tridimensional dentro de los dominios catalíticos, que a su vez dependen de la estructura primaria de la xilanasas, es decir, la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la traducción de estas diferencias en las secuencias de aminoácidos a diferencias en la funcionalidad de las xilanasas hasta ahora no se ha documentado cuando la xilanasas actúa en un entorno complejo, tal como un material vegetal, por ejemplo en un alimento para animales.

Los sustratos de xilanasas en material vegetal, por ejemplo en el trigo, se han dividido tradicionalmente en dos fracciones: El AX no extraíble en agua (WU-AX) y el AX extraíble en agua (WE-AX). Se han proporcionado muchas explicaciones acerca de por qué hay dos fracciones diferentes de AX. La bibliografía más antigua (D'Appolonia y MacArthur - (1976, Cereal Chem. 53. 711-718) y Montgomery y Smith (1955, J. Am. Chem. Soc. 77. 3325-3332) describe diferencias bastante altas en el grado de sustitución entre WE-AX y WU-AX. El grado de sustitución más alto se encontró en WE-AX. Esto se utilizó para explicar por qué algunos de los AX eran extraíbles. El alto grado

de sustitución hizo que el polímero fuera soluble en comparación con un grado de sustitución menor, lo que causaría el enlazamiento de hidrógeno entre polímeros, y en consecuencia, la precipitación.

Se pensaba que la diferencia entre la funcionalidad de xilanasas diferentes se debía a las diferencias en la especificidad de las xilanasas, y de ese modo a su preferencia por los sustratos WU-AX o WE-AX.

Se ha informado sobre enzimas xilanasas para casi 100 organismos diferentes, incluidos plantas, hongos y bacterias. Las enzimas xilanasas se clasifican en varias de las más de 40 familias de enzimas glicosil hidrolasas. Las enzimas glicosil hidrolasas, que incluyen xilanasas, mananasas, amilasas,  $\beta$ -glucanasas, celulasas, y otras carbohidrasas, se clasifican en función de propiedades tales como la secuencia de aminoácidos, su estructura tridimensional, y la geometría de su sitio catalítico (Gilkes, et al., 1991, Microbiol. Reviews 55: 303-315).

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1A muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID No. 26) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). La porción subrayada (letras minúsculas) de la secuencia refleja un péptido señal N-terminal que puede escindirse antes de que la enzima esté madura. Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación postraduccional antes de que la enzima esté completamente madura. En algunas realizaciones, esta secuencia puede ser la secuencia esqueleto.

La Figura 1B muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID No. 27) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación postraduccional antes de que la enzima esté completamente madura. En algunas realizaciones, esta secuencia puede ser la secuencia esqueleto.

La Figura 1C muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID No. 1) de una xilanasas mencionada aquí como FveXyn4. Esta es la forma activa de la enzima. Aquí se puede hacer referencia a ella como la forma madura de la enzima (en algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto).

La Figura 2A muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 24) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Los nucleótidos en letras minúsculas que están en negrita muestran la secuencia intrónica. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 2B muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 25) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 2C muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 2) que codifica una xilanasas mencionada aquí como FveXyn4.

La Figura 3A muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID No. 28) de una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). La porción subrayada (letras minúsculas) de la secuencia puede reflejar un péptido señal N-terminal que puede escindirse antes de que la enzima esté madura. Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación postraduccional antes de que la enzima esté completamente madura. En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

La Figura 3B muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID No. 29) de una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación postraduccional antes de que la enzima esté completamente madura. Esta secuencia puede ser una forma activa de la proteína, y puede ser una sola forma activa de la proteína. Aquí se puede hacer referencia a ella como la forma madura de la enzima. En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

La Figura 3C muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID No. 3) de una xilanasas mencionada aquí como FoxXyn2. Esta es otra forma activa de la enzima. En algunas realizaciones, aquí se puede hacer referencia a ella como la forma madura de la enzima. En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

La Figura 4A muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 30) que codifica una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). Los nucleótidos en letras minúsculas que están en negrita muestran la secuencia intrónica. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 4B muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 31) que codifica una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 4C muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 4) que codifica una xilanasa mencionada aquí como FoxXyn2.

La Figura 5 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID No. 5) de una xilanasa de Fusarium - Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

La Figura 6A muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 32) que codifica una xilanasa para uso en la presente invención que proviene de Fusarium - obtenida del Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). Los nucleótidos en letras minúsculas que están en negrita muestran la secuencia intrónica. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas). Los cambios comparados con SEQ ID No. 24 aparecen subrayados.

La Figura 6B muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 33) que codifica una xilanasa para uso en la presente invención que proviene de Fusarium - obtenida del Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas). Los cambios comparados con SEQ ID No. 25 aparecen subrayados.

La Figura 6C muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID No. 6) que codifica una xilanasa para uso en la presente invención que proviene de Fusarium - obtenida del Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>), los cambios con respecto a SEQ ID No. 4 están subrayados.

La Figura 7 muestra un alineamiento de las proteínas maduras para FveXyn4 (SEQ ID No. 1), FoxXyn2 (SEQ ID No. 3) y la xilanasa que se muestra aquí como SEQ ID No. 5 (FVEG\_13343T0).

La Figura 8 muestra secuencias nucleotídica (sin intrones) de las secuencias codificantes de las xilanasas GH10 variantes según la presente invención (SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, y SEQ ID No. 11).

La Figura 9 muestra secuencias nucleotídica (los intrones se muestran subrayados) de las secuencias codificantes de xilanasas GH10 variantes según la presente invención (SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, y SEQ ID No. 16).

La Figura 10 muestra secuencias de aminoácidos de las xilanasas GH10 variantes maduras según la presente invención (SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, y SEQ ID No. 21).

La Figura 11 muestra el valor de T<sub>m</sub> de las 5 variantes A, B, C, D y E en comparación con FveXyn4. El valor de T<sub>m</sub> se mide como la temperatura a la cual se obtiene 50 % de actividad residual después de 10 min de incubación.

La Figura 12 muestra el perfil de pH de las cinco variantes medido a pH 4,0, 5,0 y 6,0, y todos los datos son con respecto a FveXyn4 a pH 5,0.

Las Figuras 13a y b muestran la solubilización de pentosano de cDDGS (arriba - Figura 13a) y salvado de trigo (abajo - Figura 13b) como una función de la dosificación de la xilanasa.

La Figura 14 muestra la reducción de viscosidad en el ensayo de reducción de viscosidad en un modelo animal *in vitro* que se ilustra en el Ejemplo 1 por las variantes de la presente invención y en comparación con FveXyn4 y la referencia Econase XT. La reducción de viscosidad se mide en trigo de alta viscosidad.

La Figura 15 muestra la recuperación de xilanasa después de la peletización en el pienso a 90 y 95 °C. La actividad se muestra con respecto a la muestra de pasta. Las muestras que contienen FveXyn4 se analizaron usando el método de extracción, mientras que las muestras que contienen la variante A-E se analizaron usando el método de suspensión acuosa; ambos métodos se describen en la sección de materiales y métodos del Ejemplo 1.

La Figura 16 muestra un mapa plasmídico de pZZH254.

La Figura 17 muestra el perfil de temperatura de FveXyn4.

La Figura 18 muestra un mapa plasmídico de pZZH135.

La Figura 19 muestra el perfil de temperatura de FoxXyn2.

La Figura 20 muestra el mapa esquemático de pEntry-FveXyn4.

5 La Figura 21 muestra mapas esquemáticos del vector de destino pTTT pyr2 y vectores de expresión para las variantes de FveXyn4 (pTTTpyr2-FveXyn4) y FveXyn4s (pTTTpyr2-FveXyn4\_VAR).

10 La Figura 22 muestra la reducción de viscosidad en el material a base de grano de una enzima esqueleto (parental) FveXyn4 en comparación con las variantes termoestables A, B, C, D y E según la presente invención. Fve Xyn4 y las variantes actúan de forma similar, de manera que muestran una reducción de viscosidad de 55-67 % en comparación con el blanco (sólo SPEZYME® CL).

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

15 Una conclusión fundamental de la presente invención es la modificación de una xilanasa GH10 para hacer que la xilanasa GH10 sea más termoestable.

Por primera vez, los presentes inventores han identificado restos clave para la modificación con el fin de hacer que las xilanasas GH10 sean termoestables.

20 Además, por primera vez, los presentes inventores han identificado sustituciones/modificaciones clave con el fin de hacer que las xilanasas GH10 sean termoestables.

25 Particularmente, la invención se refiere a la identificación de restos específicos y modificaciones específicas de una xilanasa, por ejemplo una xilanasa GH10, para hacer que sea más termoestable, y al mismo tiempo asegurar que las otras propiedades de la xilanasa se mantengan sin cambios.

30 Una de las otras propiedades de la xilanasa de la presente invención es su capacidad para descomponer (solubilizar) arabinoxilanos insolubles (AXinsol).

35 En particular, las xilanasas variantes de la presente invención descomponen (solubilizan) eficazmente AXinsol a partir de una gran variedad de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular maíz y sustratos a base de maíz, en particular productos tanto de trigo (incluyendo a base de trigo) como de maíz (incluyendo a base de maíz). Esto contrasta con las enzimas conocidas anteriormente, que son frecuentemente inferiores con respecto a la solubilización de AXinsol en sustratos de maíz o a base de maíz, o que no son eficaces en sustratos a base tanto de trigo como de maíz.

40 Además, las xilanasas variantes de la presente invención son particularmente adecuadas para descomponer (solubilizar) AXinsol, y también para descomponer (o degradar) eficazmente los polímeros solubilizados. Al ser capaces de descomponer (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos disolviendo AXinsol), se obtiene una reducción de viscosidad (rápida), o los polímeros solubilizados (obtenidos disolviendo AXinsol) no pueden contribuir al aumento de la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

45 Sin desear estar atados por la teoría, la enzima variante de la presente invención libera principalmente polímeros, que no contribuyen a la viscosidad, debido a que los polímeros liberados son cortos.

50 Típicamente, las xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, pero frecuentemente conducirán a un aumento en la viscosidad de la mezcla. Esta mayor viscosidad es una desventaja en muchas aplicaciones.

Sin desear estar atados por la teoría, aunque algunas xilanasas convencionales descomponen AXinsol, estas conducen a un aumento en productos de degradación solubles de peso molecular alto, lo que conduce a un aumento en la viscosidad en la mezcla.

55 Además, o de manera alternativa, y nuevamente sin desear estar atados por la teoría, las enzimas xilanasas convencionales pueden descomponer el AXinsol, pero, dado que no degradan los productos solubilizados de peso molecular alto con la rapidez suficiente, la viscosidad en la mezcla no es ideal. En contraste, con los métodos y usos de la presente invención, las xilanasas variantes descomponen AXinsol sin aumentar la viscosidad y/o mientras reducen la viscosidad rápidamente en comparación con las enzimas convencionales. Sin desear estar atados por la teoría, se cree que los productos de peso molecular alto no se forman por las enzimas de la presente invención.

65 Se ha descubierto que las enzimas de la presente invención y como se describen aquí no sólo descomponen (solubilizan) los arabinoxilanos insolubles (AXinsol) a partir de una amplia variedad de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular sustratos de maíz y a base de maíz, en particular productos tanto de trigo (incluyendo base de trigo) como de maíz (incluyendo a base de maíz), sino también aseguran eficazmente que la

viscosidad no aumente y/o se reduzca. Sin desear estar atados por la teoría, se cree que los productos de peso molecular alto no se forman por las enzimas de la presente invención.

5 Por lo tanto, la presente invención se refiere a enzimas capaces de solubilizar pentosanos, en particular materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, en particular arabinoxilanos insolubles. En particular, la enzima es particularmente apta para solubilizar pentosanos, en particular materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, en particular arabinoxilanos insolubles, en un amplio espectro de sustratos, que incluyen los sustratos a base de maíz.

10 La presente invención se refiere además a enzimas capaces de degradar AXsol o a los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o reduzca en la mezcla de reacción.

15 Muchas de las xilanasas comercializadas para uso en alimentos para animales para solubilizar pentosanos son enzimas GH11. Los expertos en la técnica consideraban que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes solubilizando pentosanos, en particular AXinsol, en comparación con las xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha descubierto que la xilanasa novedosa descrita aquí, que es una xilanasa GH10, es particularmente apta para degradar AXinsol en un amplio espectro de sustratos, incluyendo sustratos a base de maíz. Sorprendentemente, los presentes inventores han comprobado que las xilanasas GH10 variantes de la presente invención tienen mejor rendimiento que las xilanasas GH11 comerciales en cuanto a su capacidad para solubilizar pentosanos. Además, las xilanasas GH10 variantes son termoestables.

25 El hecho de que las presentes enzimas degradan eficazmente AXinsol de sustratos de maíz y a base de maíz es significativamente ventajoso, ya que el maíz contiene mucho más AX en la forma insoluble en comparación con otros cereales, tales como por ejemplo trigo y centeno. Por lo tanto, sólo las xilanasas que pueden descomponer AXinsol pueden mostrar un beneficio significativo para los animales alimentados con la dieta basada en maíz, tal como por ejemplo la dieta basada en maíz y soja.

30 Era completamente inesperado que una xilanasa GH10 fuera tan apta para degradar AXinsol en cereales, particularmente en sustratos de maíz o a base de maíz.

35 Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar eficazmente (y rápidamente) los polímeros y oligómeros que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes en el material a base de grano. Esto conduce a una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 que se ilustran aquí, ya que son particularmente adecuadas en un número de aplicaciones para mantener la viscosidad en un nivel bajo o para reducir la viscosidad, por ejemplo en alimentos para animales; en la elaboración de cerveza y/o malta; en la producción de glucosa basada en granos, por ejemplo para el procesamiento adicional a biocombustibles y/o compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica); o en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, por ejemplo para la producción de almidón.

40 Sorprendentemente, se ha descubierto que el producto de degradación, en promedio, es más corto para las enzimas GH10 probadas aquí, en comparación con las enzimas GH11. Esto significa que los productos de degradación no contribuyen ni causan un aumento de la viscosidad.

45 En función de estos hallazgos, las xilanasas variantes según la presente invención se pueden utilizar para degradar un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente AXinsol. Adicional o alternativamente, las xilanasas según la presente invención se pueden utilizar para degradar polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes (naturalmente) en materiales a base de grano. Sorprendentemente, se ha descubierto que las xilanasas variantes según la presente invención se pueden utilizar tanto para degradar un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente AXinsol, como para degradar polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol.

55 Tales enzimas pueden aplicarse en muchas industrias, incluyendo alimentos para animales, elaboración de cerveza y malta, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilanos como materiales a base de grano; aquí, materiales a base de grano incluyen granos y cereales; en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, en la producción de jarabes derivados de almidón, en la producción de biocombustibles, y similares.

60 La expresión "xilanasa o xilanasas variantes", como se usa aquí, se puede utilizar indistintamente con la expresión "xilanasa o xilanasas modificadas".

## EXPOSICIÓN DE LA INVENCION

65 La presente invención proporciona una enzima para uso en la elaboración de cerveza o malta, en la degradación de material basado en grano, y/o en la separación del gluten de trigo del almidón, en la que dicha enzima es una

xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en dos o más de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F, o W, o en la que la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1, en la que dicho fragmento tiene al menos 60 % de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 de la cual deriva el fragmento, y en la que dicha enzima es:

a) una enzima xilanasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad, preferiblemente al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad, con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o

b) una enzima xilanasa codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 70 % de identidad, preferiblemente al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad, con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33.

La presente invención también proporciona el uso de una enzima según la invención en la elaboración de cerveza o malta, en la descomposición de material basado en grano, y/o en la separación del gluten de trigo del almidón.

La presente invención proporciona además un método para hidrolizar arabinoxilanos durante la elaboración de cerveza o malta, en el que granos de trigo, granos de cebada, o una combinación de los mismos, o porciones de los granos de trigo y/o cebada, se mezclan con la enzima para uso en la elaboración de cerveza o malta según la invención, preferiblemente en el que los arabinoxilanos son arabinoxilano insoluble en agua y arabinoxilano soluble en agua.

La presente invención también proporciona una bebida que comprende la enzima para uso en elaboración de cerveza o malta según la invención, preferiblemente en la que la bebida es una bebida fermentada, preferiblemente en la que la bebida es cerveza o vino.

La presente invención proporciona además un método para preparar una bebida fermentada, que comprende mezclar la enzima para uso en la elaboración de cerveza o malta según la invención con malta o adyuvante, preferiblemente en el que la bebida fermentada es cerveza.

La presente invención también proporciona el uso de la enzima según la invención en la degradación de arabinoxilano insoluble en agua y arabinoxilano soluble en agua durante el procesamiento de grano de un material basado en grano, preferiblemente en el que el material basado en grano es granos enteros, porciones de granos enteros, o mezclas de los mismos.

La presente invención proporciona además el uso de la enzima según la invención para degradar arabinoxilano insoluble en agua y arabinoxilano soluble en agua durante la separación del almidón de trigo y el gluten.

La presente invención también proporciona un método para separar una harina de cereal en fracciones de almidón y gluten, en la que el método comprende mezclar una harina de cereal, agua y la enzima para uso en la separación del gluten de trigo del almidón según la invención, preferiblemente en el que la harina de cereal, el agua y la enzima se mezclan simultánea o secuencialmente, preferiblemente en el que la harina de cereal y el agua se mezclan antes de mezclarlos con la enzima.

Se describe aquí una enzima xilanasa GH10 modificada o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en la que dicha xilanasa GH10 modificada o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasa GH10 parental, habiéndose modificado la xilanasa GH10 parental en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente al menos cinco de) las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, en la que la numeración se basa en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

También se describe aquí una molécula de ácido nucleico (por ejemplo una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante) que codifica una xilanasa termoestable, y que comprende (o consiste en) una secuencia polinucleotídica esqueleto que comprende (o consiste en) una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:

a. una secuencia nucleotídica mostrada aquí como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33; o

b. una secuencia nucleotídica que tiene al menos 70 % de identidad (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 % de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33; o

- c. una secuencia nucleotídica que se puede hibridar con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta.
- 5 secuencia polinucleotídica esqueleto la cual está modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en al menos cinco de) los codones que codifican los aminoácidos 7, 33, 79, 217 y 298 en el polipéptido codificado, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).
- 10 Se describe aquí un vector (por ejemplo un plásmido) o constructo que comprende (o consiste en) una secuencia polinucleotídica esqueleto que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo que consiste en:
- a. una secuencia nucleotídica mostrada aquí como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33; o
- 15 b. una secuencia nucleotídica que tiene al menos 70 % de identidad (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99% de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33; o
- 20 c. una secuencia nucleotídica que se puede hibridar con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta.
- 25 secuencia polinucleotídica esqueleto la cual está modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en al menos cinco de) los codones que codifican los aminoácidos 7, 33, 79, 217 y 298 en el polipéptido codificado, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).
- 30 Se describe aquí una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico como se describe aquí o un vector o constructo como se describe aquí.
- Se describe aquí un método para mejorar la termoestabilidad de una xilanasa GH10, que comprende: modificar una xilanasa GH10 parental en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en cinco de) las siguientes posiciones: 7, 33, 79, 217 y 298, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).
- 35 Se describe aquí una enzima que tiene actividad xilanasa; siendo dicha enzima una xilanasa GH10 o un fragmento de la misma; teniendo dicha enzima modificaciones en dos o más de (adecuadamente tres o más, adecuadamente al menos todas) las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1), y teniendo dicha enzima una mayor termoestabilidad en comparación con una xilanasa GH10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a dicha enzima, excepto por dichas modificaciones.
- 40 Se describe aquí una enzima xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en la que dicha enzima xilanasa GH10 comprende un polipéptido que tiene al menos 70 % (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 %) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más de (adecuadamente, en tres o más, adecuadamente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente 79Y, F o V, más preferiblemente, Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente 217Q, E o P, más preferiblemente, Q); y 298Y, F o W (preferiblemente Y o F, más preferiblemente, Y), en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).
- 45 Se describe aquí una enzima xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en la que dicha enzima xilanasa GH10 comprende un polipéptido que tiene al menos 90 % (adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 %) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental o esqueleto); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más de (adecuadamente, en tres o más, adecuadamente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y; 217Q; y 298Y, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).
- 50 Se describe aquí una enzima xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en la que dicha enzima xilanasa GH10 comprende un polipéptido que tiene al menos 90 % (adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 %) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental o esqueleto); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más de (adecuadamente, en tres o más, adecuadamente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y; 217Q; y 298Y, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).
- 55 También se describe aquí un método para producir una variante de xilanasa, que comprende:
- a. modificar (por ejemplo, transformar) una célula hospedadora con una molécula de ácido nucleico como se describe aquí, o un vector o constructo (por ejemplo; constructo de ADN) como se describe aquí, o con un constructo de ADN que comprende un promotor que tiene actividad transcripcional en la célula hospedadora conectado operablemente con una secuencia polinucleotídica heteróloga como se describe
- 60
- 65



aquí, o con un constructo de ADN que comprende un promotor que tiene actividad transcripcional en la célula hospedadora conectado operablemente con una secuencia polinucleotídica heteróloga que codifica una variante de xilanasa como se describe aquí;

- 5           b. cultivar la célula hospedadora modificada (por ejemplo, transformada) en un medio de cultivo adecuado, para permitir la expresión de la xilanasa.

Se describe aquí un producto fermentado producido por el método como se describe aquí.

- 10       Se describe aquí la provisión de una xilanasa producida por el método como se describe aquí.

Se describe aquí una composición enzimática que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe aquí, b) el producto fermentado como se describe aquí, o c) una combinación de los mismos.

- 15       Se describe aquí una composición de aditivo para pienso, que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe aquí, b) el producto fermentado como se describe aquí, o c) una combinación de los mismos.

- 20       Se describe aquí una premezcla, que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe aquí, b) el producto fermentado como se describe aquí, c) la composición enzimática como se describe aquí, d) una composición de aditivo para pienso como se describe aquí, o e) una combinación de los mismos; y al menos una vitamina y/o al menos un mineral.

- 25       Se describe aquí un pienso (o alimento para animales) que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe aquí, b) el producto fermentado como se describe aquí, c) la composición enzimática como se describe aquí, d) una composición de aditivo para pienso como se describe aquí, e) una premezcla como se describe aquí, o f) una combinación de los mismos.

- 30       Se describe aquí un método para preparar un alimento para animales, que comprende mezclar un componente para pienso con a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe aquí, b) el producto fermentado como se describe aquí, c) la composición enzimática como se describe aquí, d) una composición de aditivo para pienso como se describe aquí, e) una premezcla como se describe aquí, o f) una combinación de los mismos.

- 35       Se describe aquí un método para degradar material que contiene arabinoxilano en un material que contiene xilano, que comprende mezclar dicho material que contiene xilano con a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe aquí, b) el producto fermentado como se describe aquí, c) la composición enzimática como se describe aquí, d) una composición de aditivo para pienso como se describe aquí, e) una premezcla como se describe aquí, o f) una combinación de los mismos.

- 40       Se describe aquí el uso de a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma como se describe aquí, b) el producto fermentado como se describe aquí, c) la composición enzimática como se describe aquí, d) una composición de aditivo para pienso como se describe aquí, e) una premezcla como se describe aquí, o f) una combinación de los mismos, para solubilizar arabinoxilano en un material que contiene xilano.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA INVENCION

- 55       A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto normal en la técnica a la cual pertenece esta descripción. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20ª ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991), proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta descripción.

- 60       Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de otra manera, cualquier secuencia de ácido nucleico se escribe de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi, respectivamente.

- 65       Aquí se hace referencia a los aminoácidos por medio del nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras, o la abreviatura de una sola letra.

El término “proteína”, como se usa aquí, incluye proteínas, polipéptidos, y péptidos.

Como se usa aquí, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “polipéptido” y/o del término “proteína”. En algunos casos, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “péptido”. En algunos casos, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “enzima”.

Los términos “proteína” y “polipéptido” se utilizan indistintamente aquí. En la presente descripción y en las reivindicaciones, se pueden utilizar los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los restos de aminoácidos. El código de 3 letras para los aminoácidos es el que se define de acuerdo con IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Se entiende además que un polipéptido puede estar codificado por más de una secuencia nucleotídica debido a la degeneración del código genético.

Pueden encontrarse otras definiciones de términos en toda la memoria descriptiva. Además, se entiende que la terminología utilizada aquí es con la finalidad de describir realizaciones particulares solamente, y no está destinada a ser limitativa, puesto que el alcance de la presente descripción estará limitado solamente por las reivindicaciones anexas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que también se describe específicamente cada valor intermedio hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor señalado o valor intermedio en un intervalo señalado y cualquier otro valor señalado o intermedio en ese intervalo señalado queda abarcado dentro de esta descripción. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el cual alguno, ninguno o ambos límites se incluyen en los intervalos más pequeños también está comprendido dentro de esta descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo señalado. Cuando el intervalo señalado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o los dos límites incluidos también están comprendidos en esta descripción.

Debe mencionarse que, como se usa aquí y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “uno/una” y “el/la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una enzima” incluye una pluralidad de esos agentes candidato, y la referencia a “el pienso” incluye la referencia a uno o más piensos y sus equivalentes conocidos para los expertos en la técnica, etc.

Las publicaciones descritas aquí se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo descrito aquí se interpretará como una admisión de que tales publicaciones constituyen una materia anterior a las reivindicaciones anexas a la presente invención.

Los precios cada vez mayores de la materia prima utilizada tradicionalmente como fuente de energía en piensos para animales, como materia prima en la producción de biocombustibles, como un ingrediente en la elaboración de cerveza o malta, o como materia prima en procedimientos de separación del almidón del gluten de trigo, por ejemplo, han conducido a la inclusión de materiales fibrosos de bajo coste en los sustratos iniciales para estas industrias, particularmente el uso de subproductos fibrosos de bajo coste en piensos para animales.

La adición de fibras puede producir varios efectos desfavorables. Por ejemplo, en los piensos para animales, la adición de fibras puede causar efectos antinutricionales. La presencia de polímeros no degradados en el intestino de los animales genera un contenido altamente viscoso y dificulta la difusión, lo que da como resultado una absorción reducida de nutrientes. Además, los polímeros tienen una alta capacidad de retención de agua, lo que dificulta la reabsorción eficaz de agua, y la retención de agua aumenta el volumen del contenido del intestino, lo que conduce a un menor tiempo de tránsito intestinal (Englyst y Kingman (1993) en Human Nutrition and Dietetics, 9ª edición (Garrow J. S., James W. P. T., eds.) pág. 53).

En alimentos para animales, la hemicelulosa y la celulosa (que incluyen arabinoxilano insoluble) forman además barreras físicas que encapsulan (o atrapan) nutrientes como almidón y proteína, y de esa manera retienen el acceso a estos nutrientes para el animal.

La hemicelulosa y la celulosa (que incluyen arabinoxilanos insolubles (AXinsol)) en sí mismas son también fuentes de energía potenciales, ya que consisten en sacáridos de C5 y C6. Los animales pueden utilizar los monosacáridos de C6 como fuente de energía, mientras que los oligosacáridos de C5 pueden transformarse en ácidos grasos de cadena corta por la microflora presente en el intestino del animal (van den Broek et al., 2008 Molecular Nutrition & Food Research, 52, 146-63), ácidos grasos de cadena corta los cuales pueden ser absorbidos y digeridos por el intestino del animal.

La liberación de nutrientes y agua de los piensos como consecuencia de la degradación de la barrera física depende de la capacidad de la xilanasas para degradar componentes de fibra insoluble (por ejemplo, arabinoxilanos insolubles (AXinsol)).

Se describe aquí una enzima, en la que dicha enzima es una xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en la que dicha enzima o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasa GH10 parental, habiéndose modificado la xilanasa GH10 parental en, al menos, dos de las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

Se describe aquí una enzima, en la que dicha enzima es una xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en la que dicha enzima o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasa GH10 parental; modificándose la xilanasa GH10 parental en, al menos, tres de las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

Se describe aquí una enzima, en la que dicha enzima es una xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en la que dicha enzima o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasa GH10 parental; modificándose la xilanasa GH10 parental en, al menos, las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención comprende al menos dos (preferiblemente al menos tres) de las siguientes modificaciones:

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L o M;

A217Q, E, P, D o M; y

T298Y, F o W.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en al menos dos (preferiblemente al menos tres) de las posiciones indicadas:

7D;

33V;

79Y, V, F, I, L o M;

217Q, E, P, D o M; y

298Y, F o W.

En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención comprende al menos dos (preferiblemente al menos tres) de las siguientes modificaciones:

N7D;

T33V;

K79Y, F o V;

A217Q, E o P; y

T298Y o F.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en al menos dos (preferiblemente al menos tres) de las posiciones indicadas:

7D;

33V;

79Y, F o V;

217Q, E o P; y

298Y o F.

En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención comprende al menos dos (preferiblemente, al menos tres) de las siguientes modificaciones:

N7D;

T33V;

K79Y;

A217Q; y

T298Y.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en al menos dos (preferiblemente al menos tres) de las posiciones indicadas:

7D;

33V;

79Y;

217Q; y

298Y.

En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención comprende al menos las siguientes modificaciones:

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L o M;

A217Q, E, P, D o M; y

T298Y, F o W.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

7D;

33V;

79Y, V, F, I, L o M;

217Q, E, P, D o M; y

298Y, F o W.

En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención comprende al menos las siguientes modificaciones:

N7D;

T33V;

K79Y, F o V;

5 A217Q, E o P; y

T298Y o F.

10 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

7D;

15 33V;

79Y, F o V;

20 217Q, E o P; y

298Y o F.

25 En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención comprende al menos las siguientes modificaciones:

N7D;

T33V;

30 K79Y;

A217Q; y

T298Y.

35 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

40 7D;

33V;

45 79Y;

217Q; y

298Y.

50 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada según la presente invención puede estar modificada además en una o más de las siguientes posiciones: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

55 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada según la presente invención puede estar modificada además en dos o más de las siguientes posiciones: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

60 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada según la presente invención puede estar modificada además en tres o más de las siguientes posiciones: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

65 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada según la presente

invención puede estar modificada además en cuatro o más de las siguientes posiciones: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

5 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada según la presente invención puede estar modificada además en cinco o más de las siguientes posiciones: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

10 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada según la presente invención puede estar modificada además en siete o más de las siguientes posiciones: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

15 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada según la presente invención puede estar modificada además en nueve o más de las siguientes posiciones: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

20 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 25, la modificación puede ser N25P. En otras palabras, el aminoácido en el resto 25 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente P.

25 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 57, la modificación se puede seleccionar de S57Q, T o V (preferiblemente Q). En otras palabras, el aminoácido en el resto 57 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente Q, T o V (preferiblemente Q).

30 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 62, la modificación se puede seleccionar de N62T o S (preferiblemente T). En otras palabras, el aminoácido en el resto 62 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente T o S (preferiblemente T).

35 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 64, la modificación se puede seleccionar de G64T o S (preferiblemente T). En otras palabras, el aminoácido en el resto 64 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente T o S (preferiblemente T).

40 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 89, la modificación se puede seleccionar de S89G, N, Q, L o M (preferiblemente G o Q, más preferiblemente, G). En otras palabras, el aminoácido en el resto 89 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente G, N, Q, L o M (preferiblemente G o Q, más preferiblemente, G).

45 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 103, la modificación se puede seleccionar de T103M o K (preferiblemente M). En otras palabras, el aminoácido en el resto 103 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente M o K (preferiblemente M).

50 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 115, la modificación se puede seleccionar de V115E o L (preferiblemente L). En otras palabras, el aminoácido en el resto 115 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente E o L (preferiblemente L).

55 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 147, la modificación puede ser N147Q. En otras palabras, el aminoácido en el resto 147 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente Q.

60 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 181, la modificación se puede seleccionar de G181Q, A, D o P (preferiblemente Q). En otras palabras, el aminoácido en el resto 181 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente Q, A, D o P (preferiblemente Q).

65 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 193, la modificación se puede seleccionar de S193Y o N (preferiblemente Y). En otras palabras, el aminoácido en el resto 193 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente 193Y o N (preferiblemente Y).

70 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada además en la posición 219, la modificación se puede seleccionar de G219D o P (preferiblemente P). En otras palabras, el aminoácido en el resto 219 de la xilanasa GH10 de la presente invención es preferiblemente D o P (preferiblemente P).

75 En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7,

33, 79, 217 y 298, comprende además modificaciones en los siguientes restos: 25 y 89 (preferiblemente N25P y S89G).

5 En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, comprende además modificaciones en los siguientes restos: 57, 62, 64 y 89 (preferiblemente S57Q, N62T, G64T y S89G).

10 En una realización, la enzima xilanasa modificada según la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, comprende además modificaciones en los siguientes restos: 25, 57, 62, 64, 103, 115, 147, 181, 193 y 219 (preferiblemente N25P, S57Q, N62T, G64T T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y y G219P).

15 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, comprende además modificaciones en los siguientes restos: 25, 57, 62, 89, 103, 115, 147, 181, 193 y 219 (preferiblemente N25P, S57Q, N62T, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, G219P y T298Y).

20 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, comprende además modificaciones en los siguientes restos: 25, 89 y 64 (preferiblemente N25P, S89G, G64T).

25 En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) según la presente invención puede comprender los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;

b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;

30 c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;

d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;

35 e. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;

f. 79F\_217Q\_y 298F;

g. 7D,\_33V,\_217Q\_y 298F;

40 h. 7D,\_79F y 298F;

i. 33V, 79F y \_217Q;

45 j. 7D, 33V y \_298Y;

k. 33V,\_217Q\_y 298Y;

l. 7D,\_217Q y \_298F;

50 m. 7D,\_33V y 217Q;

n. 79F y 298F;

55 o. 7D y 79F;

p. 33V\_y 79F;

q. 33V\_y\_298Y;

60 r. 7D\_y 33V; o

s. 33V\_y\_A217Q.

65 En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) de acuerdo con la presente invención puede comprender los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;

b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;

c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;

d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;

e. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;

En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) según la presente invención puede comprender las siguientes modificaciones:

a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;

b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;

c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;

d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;

e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;

f. K79F\_A217Q\_T298F;

g. N7D\_T33V\_A217Q\_T298F;

h. N7D\_K79F\_T298F;

i. T33V\_K79F\_A217Q;

j. N7D\_T33V\_T298Y;

k. T33V\_A217Q\_T298Y;

l. N7D\_A217Q\_T298F;

m. N7D\_T33V\_A217Q;

n. K79F\_T298F;

o. N7D\_K79F;

p. T33V\_K79F;

q. T33V\_T298Y;

r. N7D\_T33V; o

s. T33V\_A217Q.

En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) de acuerdo con la presente invención puede comprender las siguientes modificaciones:

a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;

b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;

c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;

d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;



e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;

En una realización, la enzima xilanasa según la presente invención (por ejemplo, la enzima xilanasa modificada) tiene una secuencia de aminoácidos esqueleto (antes de la modificación) que comprende (o consiste en) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5; o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 % de identidad) con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica mostrada aquí como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 70 % de identidad (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 % de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24 o SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica que puede hibridarse con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta.

El término "parental" significa una xilanasa, preferiblemente una xilanasa GH10, en la que se ha realizado una alteración para producir una enzima modificada de la presente invención. En una realización, la enzima parental es una xilanasa GH10. De manera conveniente, la enzima parental puede ser un polipéptido de origen natural (tipo salvaje) o una variante o fragmento del mismo. En una realización preferida, la enzima parental es un polipéptido de origen natural (polipéptido de tipo salvaje).

Adecuadamente, la xilanasa modificada o la xilanasa GH10 como se describe aquí comprende (o consiste esencialmente en, o consiste en) una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a dicha enzima parental, excepto por una modificación en dos o más (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en al menos las cinco) de las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

La xilanasa modificada o la xilanasa GH10 como se describe aquí puede comprender (o consistir esencialmente en, o consistir en) una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a dicha enzima parental, excepto por una modificación en dos o más (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en al menos las cinco) de las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, así como en una o más de las siguientes posiciones 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

La xilanasa GH10 modificada o la xilanasa GH10 según la presente invención (y reivindicada, por ejemplo, en la reivindicación 1) tiene adecuadamente al menos alrededor de 90 % de identidad de secuencia (preferiblemente al menos 93 %, adecuadamente al menos 97 %, adecuadamente al menos 99 % de identidad de secuencia con la enzima parental).

El término "esqueleto", como se usa aquí, significa una secuencia polipeptídica que es un polipéptido de xilanasa GH10, que está modificado para comprender los siguientes aminoácidos en dos o más (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente 79Y, F o V, más preferiblemente, Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente 217Q, E o P, más preferiblemente, Q); y 298Y, F o W (preferiblemente Y o F, más preferiblemente, Y), en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 como se describe aquí (por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 modificada), comprende preferiblemente un polipéptido que tiene al menos 70 % (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 %) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental o esqueleto); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente 79Y, F o V, más preferiblemente, Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente 217Q, E o P, más preferiblemente, Q); y 298Y, F o W (preferiblemente Y o F, más preferiblemente, Y), en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 como se describe aquí (por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 modificada), comprende preferiblemente un polipéptido que tiene al menos 95 % (adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 %) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental o esqueleto); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más

(preferiblemente en tres o más, más preferiblemente, en todas) de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y; 217Q; y 298Y, en la que la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

En una realización, la xilanasa GH10 esqueleto o parental (antes de la modificación) es:

- a. una xilanasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5; o
- b. una enzima xilanasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 % de identidad) con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5; o
- c. una enzima xilanasa codificada por una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica mostrada aquí como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o
- d. una enzima xilanasa codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 70 % de identidad (adecuadamente al menos 80 %, adecuadamente al menos 90 %, adecuadamente al menos 95 %, adecuadamente al menos 98 %, adecuadamente al menos 99 % de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o
- e. una enzima xilanasa codificada por una secuencia nucleotídica que se puede hibridar con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta.

En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 80 % de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 90 % de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 98 % de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 80 % de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 90 % de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 98 % de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

Adecuadamente, la xilanasa GH10 parental o esqueleto puede obtenerse (obtenerse adecuadamente) de un organismo *Fusarium*.

Adecuadamente, la xilanasa parental o esqueleto es una endo-1,4-β-d-xilanasa.

La xilanasa modificada o xilanasa GH10 según la presente invención es preferiblemente una endo-1,4-β-d-xilanasa.

En una realización preferida, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, tiene un

valor de  $T_m$  mayor que 70 °C (preferiblemente mayor que 75 °C), en la que el valor de  $T_m$  se mide como la temperatura a la que se obtiene 50 % de actividad residual después de 10 min de incubación.

La termoestabilidad de una xilanasa (por ejemplo, una xilanasa modificada) según la presente invención puede determinarse usando el "ensayo para la medida de la termoestabilidad" (véase a continuación).

#### Ensayo para la medida de la termoestabilidad

Los perfiles de desnaturalización térmica de las variantes de FveXyn4 se determinaron por la diluyendo y preincubando las muestras de enzima en amortiguador MES 25 mM, pH 6,0, durante 10 min a temperaturas variables (66, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76, 76,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6, y 85 °C, respectivamente), y midiendo posteriormente la actividad residual por el método de determinación de la actividad xilanasa descrito en el Ejemplo 1. La actividad medida sin preincubación se fijó en 100 %, y la actividad residual de cada variante a cada una de las temperaturas se calculó con respecto a esta. El valor de  $T_m$  se calcula a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la que se obtiene 50 % de la actividad residual.

En una realización, una enzima se considera termoestable según la presente invención si tiene un valor de  $T_m$  mayor que 70 °C, en la que el valor de  $T_m$  es la temperatura a la que se obtiene 50 % de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de  $T_m$  puede medirse de acuerdo con el ensayo para la medida de la termoestabilidad como se enseña aquí.

En una realización, una enzima se considera termoestable según la presente invención si tiene un valor de  $T_m$  mayor que 76 °C, en la que el valor de  $T_m$  es la temperatura a la que se obtiene 50 % de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de  $T_m$  puede medirse de acuerdo con el ensayo para la medida de la termoestabilidad como se enseña aquí.

En una realización, una enzima se considera termoestable según la presente invención si tiene un valor de  $T_m$  mayor que 85 °C, en la que el valor de  $T_m$  es la temperatura a la que se obtiene 50 % de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de  $T_m$  puede medirse de acuerdo con el ensayo para la medida de la termoestabilidad como se enseña aquí.

Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención (o composición que la comprende), puede soportar un tratamiento térmico (por ejemplo, durante el procedimiento de peletización) de hasta alrededor de 70 °C, por ejemplo hasta 75 °C, por ejemplo hasta 76 °C, por ejemplo hasta alrededor de 85 °C, por ejemplo o hasta alrededor de 95 °C. El tratamiento térmico puede realizarse durante hasta alrededor de 1 minuto; hasta alrededor de 5 minutos; hasta alrededor de 10 minutos; hasta alrededor de 30 minutos; hasta alrededor de 60 minutos. Soportar tal tratamiento térmico significa que al menos alrededor de 50 % de la enzima que estaba presente/activa en el aditivo antes del calentamiento hasta la temperatura especificada todavía está presente/activa después de que se enfría hasta la temperatura ambiente. Preferiblemente, al menos alrededor de 80 % de la enzima que está presente y activa en el aditivo antes del calentamiento hasta la temperatura especificada todavía está presente y activa después de que se enfría hasta la temperatura ambiente.

El término "termoestabilidad" es la capacidad de una enzima para resistir la inactivación irreversible (habitualmente por desnaturalización) a una temperatura relativamente alta. Esto significa que la enzima retiene una cantidad especificada de actividad enzimática después de la exposición a una temperatura identificada durante un período de tiempo dado.

Hay muchas maneras de medir la termoestabilidad. A título de ejemplo, las muestras de enzima pueden incubarse sin un sustrato durante un período de tiempo definido (por ejemplo, 10 min, o 1 a 30 min) a una temperatura elevada en comparación con la temperatura a la que la enzima es estable durante un tiempo más prolongado (días). Después de la incubación a temperatura elevada, la muestra de enzima se analiza para determinar la actividad residual a la temperatura tolerante de por ejemplo 30 °C (alternativamente 25 a 50 °C, o incluso hasta 70 °C). La actividad residual se calcula con respecto a una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada.

La termoestabilidad puede medirse también como inactivación de la enzima en función de la temperatura. En este caso, las muestras de enzima se incuban sin un sustrato durante un período de tiempo definido (por ejemplo, 10 min, o 1 a 30 min) a diversas temperaturas, y después de la incubación, se analizan para determinar la actividad residual a la temperatura tolerante de por ejemplo 30 °C (alternativamente 25-70 °C, o incluso más alta). La actividad residual a cada temperatura se calcula con respecto a una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada. El perfil de desnaturalización térmica resultante (la temperatura frente a la actividad residual) se puede utilizar para calcular la temperatura a la que se obtiene 50 % de la actividad residual. Este valor se define como el valor de  $T_m$ .

Aún más, la termoestabilidad puede medirse como la inactivación de la enzima en función del tiempo. Aquí, las muestras de enzima se incuban sin un sustrato a una temperatura elevada definida (por ejemplo, 76°C) durante diversos períodos de tiempo (por ejemplo, entre 10 s y 30 min), y después de la incubación, se analizan para determinar la actividad residual a la temperatura tolerante de por ejemplo 30 °C (alternativamente, 25-70 °C, o incluso más alta). La actividad residual a cada temperatura se calcula con respecto a una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada. El perfil de inactivación resultante (tiempo frente a actividad residual) se puede utilizar para calcular el tiempo en el que se obtiene 50 % de la actividad residual. Este se proporciona habitualmente como T1/2.

Estos son ejemplos de cómo medir la termoestabilidad. La termoestabilidad puede medirse también con otros métodos. Preferiblemente, la termoestabilidad se evalúa mediante el uso del "ensayo para la medida de la termoestabilidad" como se enseña aquí.

En contraposición con la termoestabilidad, la termoactividad es la actividad de la enzima en función de la temperatura. Para determinar la termoactividad, las muestras de enzima pueden incubarse (analizarse) durante el período de tiempo definido por el ensayo a diversas temperaturas en presencia de un sustrato. La actividad enzimática se obtiene durante o inmediatamente después de la incubación según lo definido por el ensayo (por ejemplo, la lectura de un valor de DO que refleja la cantidad de producto de reacción formado). La temperatura a la que se obtiene la actividad más alta es la temperatura óptima de la enzima en las condiciones de ensayo dadas. La actividad obtenida a cada temperatura puede calcularse con respecto a la actividad obtenida a la temperatura óptima. Esto proporcionará un perfil de temperatura para la enzima en las condiciones de ensayo dadas.

En la presente solicitud, termoestabilidad no es lo mismo que termoactividad.

Adecuadamente, la xilanasa modificada según la presente invención tiene un pH óptimo en el intervalo de 4,6 a 7, preferiblemente alrededor de 5 a 6.

En una realización preferida, la xilanasa modificada según la presente invención comprende una de las secuencias de aminoácidos que se muestran aquí como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, o SEQ ID No. 21, o un fragmento de la mismas, que tiene actividad xilanasa.

En una realización, las modificaciones en la secuencia polinucleotídica esqueleto son tales que proporcionan las modificaciones detalladas anteriormente en la secuencia de aminoácidos codificada:

Los métodos como se describen aquí son adecuados para proporcionar las modificaciones como se enseñó anteriormente en la secuencia polinucleotídica o de aminoácidos.

La célula hospedadora como se describe aquí se puede seleccionar del grupo que consiste en una célula bacteriana, célula fúngica, célula de levadura, célula fúngica filamentosa, y una célula vegetal. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula bacteriana o fúngica.

En una realización preferida, se recupera la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención producida según un método como se describe aquí.

En una realización preferida, se aísla y/o purifica la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención producida según un método como se describe aquí.

En algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, se puede utilizar directamente como un producto fermentado, sin aislamiento y/o purificación de la enzima.

La composición de aditivo para pienso como se describe aquí, o la premezcla como se describe aquí, comprende además una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una amilasa (incluyendo  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y  $\gamma$ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)).

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, se puede utilizar en un método para degradar material que contiene arabinoxilano en un material que contiene xilano.

Adecuadamente, el arabinoxilano puede ser arabinoxilano insoluble (AXinsol).

En una realización, el material que contiene xilano se selecciona de uno o más del grupo que consiste en un pienso o alimento para animales; un componente para pienso; un material a base de grano; un producto macerado; un mosto; una malta; cebada malteada; un agente adicional, un producto macerado de cebada; y una harina de cereal.

5 En una realización preferida, los arabinoxilanos se solubilizan sin aumentar la viscosidad en el medio de reacción.

En una realización de la presente invención, el pienso o alimento para animales o componente para pienso comprende o consiste en maíz, DDGS (tal como cDDGS), trigo, salvado de trigo, o una combinación de los mismos.

10 En una realización preferida, el pienso o alimento para animales es un alimento para animales basado en maíz.

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, se pueden utilizar en combinación con una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una amilasa (incluyendo  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y  $\gamma$ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)).

El método o uso como se describe aquí puede comprender administrar a un sujeto una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma como se describe aquí, o un producto fermentado que comprende dicha enzima como se describe aquí, o una composición enzimática que comprende dicha enzima xilanasa como se describe aquí, o una composición de aditivo para piensos que comprende dicha enzima xilanasa como se describe aquí, o una premezcla que comprende dicha enzima xilanasa como se describe aquí, o un alimento para animales que comprende dicha enzima xilanasa como se describe aquí.

En una realización, el método o uso de la presente invención es (o es parte de) un procedimiento de separación del gluten de trigo del almidón.

30 En otra realización, el método o uso de la presente invención es (o es parte de) un procedimiento de producción de un biocombustible (por ejemplo, bioetanol) o compuesto bioquímico (por ejemplo, isopreno de base biológica).

En otra realización, el método o uso de la presente invención es (o es parte de) un procedimiento de elaboración de cerveza o malta.

35 Adecuadamente, se describe aquí una bebida fermentada, por ejemplo cerveza, producida por un método según la presente invención.

En una realización, la enzima xilanasa parental de la presente invención puede denominarse aquí como FveXyn4.

40 Tanto las secuencias polipeptídicas como las secuencias de ácido nucleico que se enseñan aquí están preferiblemente aisladas.

La xilanasa de la presente invención es una xilanasa GH10. En otras palabras, la xilanasa puede tener un peso molecular en el intervalo de 32-39 kDa, y/o el dominio catalítico de la xilanasa consiste en una estructura de barril  $\beta/\alpha$  de ocho pliegues (como enseñan Harris et al, en 1996 - Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

En un aspecto de la invención, la xilanasa de la invención es una xilanasa de la familia 10 de las glucósido hidrolasas (GH). La expresión "de la familia 10 de las glucósido hidrolasas (GH)" significa que la xilanasa en cuestión es de, o puede clasificarse en, la familia 10 de GH.

Las búsquedas de similitud entre proteínas (por ejemplo, Blast para proteínas en [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) pueden determinar si una secuencia desconocida cae dentro de la expresión de un miembro de la familia de xilasas GH10, particularmente las familias GH pueden categorizarse según la homología de secuencias en regiones clave. Adicional o alternativamente, para determinar si una secuencia proteica desconocida es una proteína xilanasa dentro de la familia GH10, la evaluación puede hacerse no sólo para la similitud/homología/identidad de secuencias, sino también para la similitud de estructuras 3D. La clasificación de familias GH se basa a menudo en el plegamiento 3D. El software que predice el plegamiento 3D de una secuencia proteica desconocida es HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). La potencia de este software para predecir la estructura proteica se basa en identificar secuencias homólogas con estructura conocida que se van a utilizar como molde. Esto funciona bien porque las estructuras divergen mucho más lentamente que las secuencias primarias. Las proteínas de la misma familia pueden tener estructuras muy similares aun cuando sus secuencias hayan divergido más allá del reconocimiento.

En la práctica, una secuencia desconocida puede “pegarse” en el software (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) en el formato FASTA. Una vez hecho esto, puede enviarse la búsqueda. El resultado de la búsqueda mostrará una lista de secuencias con estructuras 3D conocidas. Para confirmar que la secuencia desconocida es efectivamente una xilanasa GH10, las xilanasas GH10 pueden encontrarse dentro de la lista de homólogos que tienen una probabilidad de > 90. No todas las proteínas identificadas como homólogos se caracterizarán como xilanasas GH10, pero algunas lo harán. Las últimas proteínas son proteínas con una estructura conocida y caracterización bioquímica que las identifica como xilanasas. Las primeras no se han caracterizado bioquímicamente como xilanasas GH10. 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 (<http://www.cazy.org/>), la familia 10 de glucósido hidrolasas puede caracterizarse como sigue:

Actividades conocidas: endo-1,4- $\beta$ -xilanasa (EC 3.2.1.8); endo-1,3- $\beta$ -xilanasa (EC:3.2.1.32); tomatinasa (EC 3.2.1.-)

Mecanismo: Retención

Clan: GH-A

Base/nucleófilo catalítico Glu (experimental)

Donante de protón catalítico: Glu (experimental)

Estado de la estructura 3D: ( $\beta / \alpha$ )<sub>8</sub>

La xilanasa GH10 de la presente invención puede tener un dominio catalítico con pesos moleculares en el intervalo de 32-39 kDa. La estructura del dominio catalítico de la xilanasa GH10 de la presente invención consiste en un barril  $\beta/\alpha$  de 8 pliegues (Harris et al 1996 - Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

Las estructuras tridimensionales están disponibles para un gran número de enzimas de la Familia GH10, siendo las primeras resueltas aquellas de la xilanasa A de *Streptomyces lividans* (Derewenda et al, J Biol Chem 1994 agosto 19; 269(33) 20811-4), la endoglucanasa Cex de *C. fimi* (White et al Biochemistry, 1994 octubre 25; 33(42) 12546-52) y la Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (anteriormente, *Pseudomonas fluorescens* subesp. xilanasa A) (Harris et al Structure 1994 noviembre 15; 2(11) 1107-16). Como miembros del Clan GHA tienen un plegamiento de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> clásico con los dos ácidos glutámicos clave del sitio activo ubicados en los extremos C-terminal de las hebras beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat et al, Proc Natl Acad Sci U S A 18 de julio de 1995; 92(15) 7090-4).

La expresión “xilanasa GH10”, como se usa aquí, significa un polipéptido que tiene actividad xilanasa y que tiene un plegamiento de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub>, con los dos ácidos glutámicos clave del sitio activo ubicados en los extremos C-terminal de las hebras beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo).

La enzima xilanasa esqueleto (o parental) usada aquí puede referirse como FveXyn4 o FoxXyn 2 (estos términos se refieren a las proteínas activas, por ejemplo las proteínas maduras).

En una realización, preferiblemente la xilanasa es una xilanasa fúngica.

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención y/o enzima parental es una xilanasa GH10.

En una realización, preferiblemente la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención (y/o xilanasa parental), es una xilanasa GH10 fúngica.

En una realización, preferiblemente la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención (y/o xilanasa parental), es una endoxilanasa, por ejemplo una endo-1,4- $\beta$ -d-xilanasa. La clasificación para una endo-1,4- $\beta$ -d-xilanasa es E.C. 3.2.1.8.

En algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, tiene un pH óptimo a alrededor de 6.

Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, retiene más de 70 % de la actividad máxima entre pH 4 y 8, adecuadamente entre pH 4,6 y 7.

5 En algunas realizaciones, por ejemplo en aplicaciones para pienso, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, retiene preferiblemente más de 70 % de la actividad máxima entre 5,1 y 7.

10 Sin desear estar limitados por la teoría, el pH puede tener también un efecto importante en la eficiencia y eficacia de la enzima. Para aplicaciones para pienso particularmente, el perfil de pH de las xilanasas como se describen aquí favorece la actividad en el intestino delgado, en condiciones neutras.

15 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, es capaz de degradar (o degrada) un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente arabinoxilanos insolubles (AXinsol).

20 En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, es capaz de degradar (o degrada) polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes (naturalmente) en el material a base de grano.

25 En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, es capaz de degradar (o degrada) tanto un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente AXinsol, como polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol.

30 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, no se ve afectada por los inhibidores de xilanasas de trigo, por ejemplo inhibidores proteicos, por ejemplo inhibidores proteicos de tipo TAXI en trigo. Las xilanasas fúngicas de la técnica anterior pueden inhibirse tanto como 70-95 % por los inhibidores proteicos del trigo. Preferiblemente, las xilanasas de la presente invención se inhiben solamente en 20-30 % en la mayoría de las aplicaciones de trigo.

35 TAXI son los inhibidores de xilanasas de *Triticum aestivum*, presentes en cereales.

40 La expresión "que consiste esencialmente en", como se usa aquí, significa que los componentes no especificados pueden estar presentes si las características de la composición reivindicada no resultan de ese modo materialmente afectadas.

La expresión "que consiste en" significa que las proporciones de los ingredientes específicos deben dar un total de 100 %.

45 La expresión "que comprende", usado aquí, puede modificarse en algunas realizaciones para referirse a que consiste esencialmente en o que consiste en (teniendo ambos un significado más limitado que "que comprende").

En una realización, el material que contiene arabinoxilano insoluble no es paja de trigo.

50 La expresión "fragmento de la misma", como se usa aquí, significa un fragmento activo. En otras palabras, el fragmento es un fragmento que tiene actividad xilanasa. Adecuadamente, el fragmento puede tener la misma actividad xilanasa que la enzima xilanasa GH10 modificada de longitud completa de la cual deriva el fragmento. Alternativamente, el fragmento puede tener una actividad modificada (por ejemplo, especificidad, actividad específica, pH o perfil de temperatura mejorados) en comparación con la enzima xilanasa GH10 modificada de longitud completa de la cual deriva el fragmento. Adicionalmente, el fragmento debe retener las propiedades termoestables de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual es un fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos 60 % de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

60 En una realización, el fragmento es al menos 75 % de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos 85 % de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

65

En una realización, el fragmento es al menos 95 % de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

5 En una realización, el fragmento es al menos 98 % de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es un fragmento de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No. 17, SEQ. ID. No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, o SEQ ID No. 21.

10 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención, a) comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas aquí como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21, o b) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96 %, preferiblemente al menos 98,5 % de identidad con las secuencias de aminoácidos mostradas aquí como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21, siempre que los aminoácidos en las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 sean idénticos a los mostrados en SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, o SEQ ID No. 21.

20 Se describe aquí una molécula de ácido nucleico como se describe aquí, o un vector o constructo que la comprende, en la que la secuencia nucleotídica se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 y SEQ ID No. 16; o una secuencia nucleotídica que es al menos 96 %, preferiblemente 98,5 %, idéntica a las secuencias nucleotídicas mostradas aquí como SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 or SEQ ID No. 16 en tanto que los codones que codifican las posiciones de aminoácidos 7, 33, 79, 217 y 298 en la proteína madura sean iguales que los de SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 o SEQ ID No. 16.

30 La expresión "que modifica", como se usa aquí, significa que cambia o altera. Particularmente, la expresión "que modifica", como se usa aquí, significa que altera con respecto a lo que se encuentra en la naturaleza. En otras palabras, al modificar la enzima, la enzima se modifica de tal manera que queda alterada con respecto a la enzima esqueleto parental. Preferiblemente, la enzima modificada no existe como tal en la naturaleza. Por lo tanto, la enzima modificada es una enzima que no es de origen natural.

35 El término "modificada", como se usa aquí, significa alterada, por ejemplo con respecto a su forma de origen natural. Las enzimas modificadas según la presente invención son preferiblemente enzimas que no son de origen natural o variantes de un origen natural. En otras palabras, las enzimas modificadas según la presente invención son preferiblemente enzimas modificadas que no se encuentran en la naturaleza. Preferiblemente, las enzimas modificadas de la presente invención no aparecen espontáneamente.

40 En algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, se prepara modificando una enzima parental o una enzima esqueleto. Sin embargo, en otras realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, se prepara sin modificar una enzima parental o una enzima esqueleto, por ejemplo puede prepararse sintéticamente. La expresión "xilanasa modificada" o "xilanasa GH10 modificada", como se usa aquí, no determina que la xilanasa se ha preparado mutando una enzima parental. La xilanasa modificada se puede haber preparado adecuadamente por otros métodos, por ejemplo sintéticamente.

## 50 USOS

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, se puede usar adecuadamente en cualquiera de las aplicaciones siguientes:

- 55 a) Un aditivo en piensos para animales; y/o
- b) Un suplemento de pienso para un animal; y/o
- 60 c) La descomposición del material a base de grano (por ejemplo, este puede ser grano entero o parte del grano). Los productos de descomposición (por ejemplo, glucosa) se pueden usar como materia prima para cualquier procedimiento de fermentación, tal como en la producción de biocombustibles (por ejemplo, bioetanol) o en la producción de otros productos tales como compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica). Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) y al uso mejorado de materiales a base de grano
- 65 en la industria de los biocombustibles; y/o



d) La industria de separación del gluten de cereales (por ejemplo, trigo) del almidón. El producto o los productos resultantes pueden ser almidón (por ejemplo, almidón purificado) y/o gluten y/o fibras y/o sustancias solubles en agua (tales como pentosanos solubles). En una realización, la presente invención se refiere a la producción de almidón y/o gluten; y/o

e) La mejora en la elaboración de cerveza y malta, por ejemplo descomponiendo material a base de grano (por ejemplo, cebada malteada), y/o

f) para degradar AXsol o los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no aumente y/o la viscosidad se reduzca en la mezcla de reacción;

g) para reducir la viscosidad cuando se degradan materiales a base de grano, por ejemplo en procedimientos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma como se describe aquí, se puede usar en un alimento para animales. Preferiblemente, un alimento para animales comprende maíz, o es un alimento para animales basado en maíz.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, se usa en la elaboración de cerveza o malta.

En una realización adicional, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, se usa en la separación del gluten de trigo del almidón.

En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, se usa en la descomposición de material a base de grano, y puede ser parte del procedimiento de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

## VENTAJAS

La nueva enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma ilustrada aquí, tiene muchas ventajas en comparación con las xilanasas conocidas.

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, es termoestable. Por ejemplo, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, es significativamente más estable que la xilanasa parental (esqueleto) antes de la modificación. Adecuadamente, la xilanasa modificada tiene un valor de T<sub>m</sub> mayor que 70 °C (preferiblemente mayor que 75 °C), en la que el valor de T<sub>m</sub> se mide como la temperatura a la cual se obtiene 50 % de actividad residual después de 10 min de incubación.

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, también es inesperadamente adecuada para solubilizar pentosanos.

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, es inesperadamente adecuada para solubilizar AXinsol.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, es particularmente adecuada para degradar materiales que contienen arabinoxilanos, por ejemplo AXinsol, en un amplio espectro de sustratos, maíz, trigo, DDGS, etc., particularmente sustratos de maíz y a base de maíz, particularmente productos tanto de trigo (que incluyen productos a base de trigo) como de maíz (que incluyen productos a base de maíz). En comparación con las xilanasas de referencia que son todas xilanasas producidas y distribuidas comercialmente, la nueva xilanasa ilustrada aquí tenía una capacidad mucho más eficiente de degradación y de liberación de pentosanos a partir de más materiales basados en plantas (particularmente sustratos a base de maíz) en comparación con las xilanasas comercializadas. Esto resultó ser totalmente inesperado. Esto contrasta con las enzimas conocidas anteriormente, que son frecuentemente inferiores con respecto a la solubilización de AXinsol en sustratos de maíz o a base de maíz, o que no son tan eficaces en sustratos tanto a base de trigo como a base de maíz.

Además, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, es particularmente buena no sólo descomponiendo (solubilizando) AXinsol, sino también descomponiendo (o degradando) eficazmente los polímeros solubilizados. La capacidad de descomponer (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos a partir de la disolución del AXinsol) permite obtener una reducción de la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

Típicamente, las xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, pero esto conducirá a un aumento en los productos de producción de polímeros, lo que conducirá a un aumento en la viscosidad de la mezcla. Esta mayor viscosidad es una desventaja en muchas aplicaciones.

Se ha descubierto que la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención y como se describe aquí, no sólo descompone (solubiliza) arabinoxilanos insolubles (AXinsol) a partir de una amplia variedad de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular sustratos de maíz y a base de maíz, en particular productos de trigo (que incluyen productos a base de trigo) y maíz (que incluyen productos a base de maíz), sino también descompone eficazmente los polímeros solubilizados de esta manera para asegurar que la viscosidad no aumente y/o para reducir la viscosidad.

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención y como se describe aquí, tiene la capacidad de degradar AXsol o los productos de la descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no aumente y/o que la viscosidad se reduzca en la mezcla de reacción.

Muchas de las xilanasas comercializadas para uso en alimentos para animales para solubilizar pentosanos son enzimas GH11. Los expertos en la técnica han considerado que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes solubilizando pentosanos, particularmente, AXinsol, en comparación con las xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha descubierto que la o las nuevas xilanasas modificadas descritas aquí, que son xilanasas GH10, son particularmente adecuadas para solubilizar AXinsol en un amplio espectro de sustratos, que incluyen los sustratos a base de maíz. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que las xilanasas GH10 modificadas de la presente invención (y que se ilustran aquí) tienen mejor rendimiento que las xilanasas GH11 comerciales con respecto a su capacidad para solubilizar pentosanos.

El hecho de que las presentes enzimas solubilizan eficazmente AXinsol a partir de sustratos de maíz y a base de maíz es significativamente ventajoso, ya que el maíz contiene mucho más AX en la forma insoluble en comparación con otros cereales, tales como por ejemplo trigo y centeno. Por lo tanto, sólo las xilanasas que pueden descomponer el AXinsol pueden mostrar un beneficio significativo para los animales alimentados con una dieta de maíz-soja, por ejemplo.

Era completamente inesperado que una xilanasa GH10 fuera tan adecuada solubilizando AXinsol en cereales, particularmente en sustratos de maíz y a base de maíz.

Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar eficazmente (y rápidamente) los polímeros y/u oligómeros producidos a partir de la solubilización del AXinsol o que están presentes en materiales a base de granos. Esto conduce a una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 modificadas ilustradas aquí por cuanto son particularmente adecuadas en varias aplicaciones para mantener la viscosidad baja o para reducir la viscosidad, por ejemplo en alimento para animales; en la elaboración de cerveza y/o malta; en la producción de glucosa basada en granos, por ejemplo para el procesamiento adicional a biocombustibles y/o compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica); o en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, por ejemplo para la producción de almidón.

Además, la xilanasa GH10 modificada de la presente invención es particularmente termoestable. Esto proporciona ventajas significativas en algunas aplicaciones. Particularmente, en aplicaciones para pienso, las enzimas pueden someterse al tratamiento térmico, por ejemplo durante los procedimientos de peletización. Por lo tanto, es necesario que las enzimas mantengan su actividad después de dicho procesamiento. Las xilanasas modificadas de la presente invención son particular e inesperadamente termoestables.

Asimismo, una termoestabilidad mejorada es también muy beneficiosa durante la degradación de almidón, que tiene lugar a temperaturas elevadas durante la licuefacción (alrededor de 85-95 °C). La termoestabilidad permite la adición de la enzima durante esta etapa.

Notablemente, se ha descubierto que el producto de degradación a partir del uso de la xilanasa modificada es más corto en promedio para las enzimas GH10 probadas aquí en comparación con las enzimas GH11. Esto mejora la reducción del efecto de la viscosidad.

Además, una ventaja adicional de la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención (a diferencia de muchas xilanasas GH11), es que no se ve afectada por los inhibidores de xilanasa de trigo, por ejemplo inhibidores proteicos de tipo TAXI, que se producen en el trigo.

Una ventaja de la presente invención es que mejora la separación del almidón del gluten de trigo.

La enzima de la presente invención es particularmente eficaz para mejorar la capacidad de un sujeto o mejorar la digestibilidad de una materia prima en un pienso y/o para mejorar la eficacia del pienso en un sujeto.

## **MATERIAL QUE CONTIENE XILANO**

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención (o composición que comprende la xilanasa modificada de la presente invención), se puede utilizar para degradar cualquier material que contiene xilano.

En una realización, el material que contiene xilano es cualquier material vegetal que comprende arabinoxilano.

En una realización, el material que contiene xilano es cualquier material vegetal que comprende arabinoxilano insoluble (AXinsol).

En una realización, el material que contiene xilano es un componente de un alimento para animales o pienso.

En una realización, el material que contiene xilano es un material a base de grano (que incluye granos enteros o partes de granos o granos malteados, por ejemplo cebada malteada). Cuando el método se refiere a la producción de biocombustibles (por ejemplo, producción de bioetanol), entonces preferiblemente el material que contiene xilano es un material a base de grano.

En otra realización, el material que contiene xilano puede ser una pasta o malta de cebada, o cebada malteada o combinaciones de las mismas.

En aún una realización adicional, el material que contiene xilano puede ser una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo, avena, centeno o cebada). Cuando el método se refiere a un procedimiento de separación del almidón del gluten, preferiblemente el material que contiene xilano es una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo, avena, centeno o cebada).

## **DESCOMPOSICIÓN O DEGRADACIÓN**

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención (o composición que comprende la enzima), se puede usar para descomponer (degradar) AXinsol o AXsol o los productos de degradación de AXinsol.

Los términos "descomponer" o "degradar" son sinónimos de hidrólisis.

## **SOLUBILIZACIÓN / DEGRADACIÓN**

Se describe aquí un método para degradar un material que contiene xilano (preferiblemente un material que contiene arabinoxilano, preferiblemente un material que contiene arabinoxilano insoluble (AXinsol)) para producir pentosanos solubles (que pueden ser poliméricos, oligoméricos o monoméricos).

Este método puede describirse aquí como solubilización de pentosano o solubilización de arabinoxilano o solubilización de AXinsol o degradación de AXinsol.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para degradar (o descomponer) arabinoxilano insoluble (AXinsol). Esto también puede denominarse como solubilización de arabinoxilano insoluble y/o solubilización de pentosanos.

En una realización adicional de la presente invención, el método se refiere a degradar (por ejemplo, descomponer) polímeros derivados de la degradación de arabinoxilanos insolubles.

## **ARABINOXILANO (AX)**

El término "arabinoxilanos" (AX), como se usa aquí, significa un polisacárido que consiste en un esqueleto de xilano (unidades de xilosa enlazadas 1,4), con L-arabinofuranosa (L-arabinosa en su forma anular de 5 átomos) unida aleatoriamente por enlaces  $1\alpha \rightarrow 2$  y/o  $1\alpha \rightarrow 3$  a las unidades de xilosa a lo largo de la cadena. El arabinoxilano es

una hemicelulosa encontrada en las paredes de células tanto primarias como secundarias de las plantas. El arabinoxilano puede encontrarse en el salvado de granos tales como trigo, maíz dulce (maíz), centeno, y cebada.

El arabinoxilano (AX) se encuentra en estrecha asociación con la pared de la célula vegetal, en la que actúa como un pegamento que une diversos bloques de construcción del tejido y pared de la célula vegetal, y les proporciona resistencia y rigidez estructural.

El término "pentosano", como se utiliza aquí, es cualquiera de un grupo de hidratos de carbono que producen pentosas en la hidrólisis completa.

Puesto que xilosa y arabinosa (los constituyentes de arabinoxilanos) son ambas pentosas, los arabinoxilanos se clasifican habitualmente como pentosanos.

AX es la principal fracción de polisacárido no de almidón (NSP) en varias de las materias primas de pienso más importantes, incluyendo trigo y maíz.

Su abundancia, ubicación dentro del material vegetal, y estructura molecular, hacen que AX tenga un impacto negativo grave en la digestibilidad del pienso, reduciendo eficazmente el valor nutricional de las materias primas en las que está presente. Esto hace que el AX sea un factor antinutricional importante, reduciendo la eficacia de la producción animal.

Además, AX puede tener un impacto negativo severo cuando se intenta descomponer material vegetal, por ejemplo en procedimientos tales como la elaboración de cerveza, elaboración de malta, fabricación de biocombustibles, reduciendo eficazmente la cantidad de sustrato accesible en el material vegetal bruto.

Los AX también pueden contener cantidades sustanciales de agua (que puede mencionarse como su capacidad de retención de agua) - esto puede hacer que los arabinoxilanos solubles tengan viscosidad (alta) - lo que constituye una desventaja en muchas aplicaciones.

El término "hemicelulosa", como se usa aquí, significa los componentes polisacáridos de las paredes celulares de la planta distintos de celulosa. El término "hemicelulosa", como se usa aquí, puede significar polisacáridos en las paredes celulares de las plantas, que son extraíbles mediante disoluciones alcalinas diluidas. Las hemicelulosas comprenden casi un tercio de los hidratos de carbono en el tejido de plantas leñosas. La estructura química de las hemicelulosas consiste en cadenas largas de una variedad de pentosas, hexosas y sus correspondientes ácidos urónicos. Las hemicelulosas pueden encontrarse en frutas, tallos de las plantas, y cáscaras de cereales. El xilano es un ejemplo de un pentosano que consiste en unidades de D-xilosa con enlaces 1β-4.

#### **ARABINOXILANO INSOLUBLE EN AGUA (AXinsol)**

El arabinoxilano insoluble en agua (AXinsol), también conocido como arabinoxilano no extraíble en agua (WU-AX), constituye una proporción significativa de la materia seca del material vegetal.

En el trigo, el AXinsol puede representar 6,3 % de la materia seca. En el salvado de trigo y DDGS de trigo, el AXinsol puede representar alrededor de 20,8 % o 13,4 % de la materia seca (p/p).

En el centeno, el AXinsol puede representar 5,5 % de la materia seca.

En el maíz, el AXinsol puede representar 3,5-6 % (por ejemplo, 5,1 %) de la materia seca. En el DDGS de maíz, el AXinsol puede representar 10-20 % (por ejemplo, 12,6 %) de la materia seca.

El AXinsol causa el atrapamiento de nutrientes en el pienso. Cantidades grandes de nutrientes muy digeribles, tales como almidón y proteínas, quedan encerradas en grupos de material de pared celular o unidas a cadenas laterales del AX. Estos nutrientes atrapados no estarán disponibles para la digestión y la absorción posterior en el intestino delgado.

#### **ARABINOXILANO SOLUBLE EN AGUA (AXsol)**

El arabinoxilano soluble en agua (AXsol), también conocido como arabinoxilano extraíble en agua (WE-AX), puede causar problemas en la producción de biocombustibles, producción de compuestos bioquímicos, procesamiento de hidratos de carbono y/o elaboración de cerveza y/o malta y/o en pienso, ya que puede causar una mayor viscosidad debido a la capacidad higroscópica del AXsol.

En el pienso, el AXsol puede tener un efecto antinutricional, particularmente, en animales monogástricos, ya que causa un aumento considerable de la viscosidad del contenido intestinal, debido a la capacidad higroscópica extraordinaria del AXsol. El aumento en la viscosidad puede afectar la capacidad para digerir el pienso y el uso de

nutrientes, ya que puede evitar el mezclado adecuado del pienso con enzimas digestivas y sales biliares y/o reduce la disponibilidad y absorción de nutrientes y/o estimula la fermentación en el intestino terminal.

En el trigo, el AXsol puede representar 1,8 % de la materia seca. En el salvado de trigo y DDGS de trigo, el AXsol puede representar alrededor de 1,1 % o 4,9 % de la materia seca (p/p).

En el centeno, el AXsol puede representar 3,4 % de la materia seca.

En la cebada, el AXsol puede representar 0,4-0,8 % de la materia seca.

En el maíz, el AXsol puede representar 0,1-0,4 % (por ejemplo, 0,1 %) de la materia seca. En el DDGS de maíz, el AXinsol puede representar 0,3-2,5 % (por ejemplo, 0,4 %) de la materia seca.

Sin embargo, además de la cantidad de AXsol presente en el material vegetal, cuando una xilanasas solubiliza AXinsol en el material vegetal, este puede liberar pentosanos y/u oligómeros que contribuyen al contenido de AXsol del material vegetal.

Una ventaja significativa de las xilanasas modificadas descritas aquí es que tienen la capacidad de solubilizar AXinsol sin aumentar la viscosidad. Actualmente, se cree que no se forman productos de peso molecular alto.

Una descomposición del AXsol puede disminuir la viscosidad.

Una descomposición del AXsol puede liberar nutrientes.

## VISCOSIDAD

La presente invención se puede usar para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o para reducir la viscosidad en cualquier procedimiento en el que la capacidad higroscópica del AXsol causa un aumento indeseable en la viscosidad.

La presente invención se refiere a asegurar que la viscosidad no se incremente y/o a reducir la viscosidad por la descomposición (degradación) de AXsol o la descomposición (degradación) de los polímeros y/u oligómeros producidos solubilizando AXinsol.

Sin estar limitados por la teoría, la capacidad de descomponer (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (por ejemplo, oligómeros) obtenidos disolviendo AXinsol permite evitar un aumento indeseado en la viscosidad y/u obtener una reducción en la viscosidad. El término "eficazmente", como se usa aquí, significa que la enzima es capaz de degradar los polímeros (por ejemplo, oligómeros) que se forman por la solubilización del AXinsol con mayor rapidez que la velocidad con la cual se degrada (o solubiliza) el AXinsol.

La reducción de la viscosidad tiene ventajas en muchas aplicaciones como se ilustra aquí.

Un ensayo in vitro que intenta imitar el ambiente en el intestino delgado de un pollo se describió originalmente por Bedford y Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). El ensayo consiste en una incubación de dos etapas del pienso, primero a pH bajo con pepsina, seguido de la incubación con pancreatina a pH neutro. Generalmente, se acepta que la viscosidad del sobrenadante después de la incubación final se correlaciona con la viscosidad creada in vivo en los pollos de engorde.

Sin aumentar la viscosidad y/o una reducción en la viscosidad, como se ilustra aquí para aplicaciones de pienso, significa que la adición de la xilanasas dará como resultado una viscosidad sin modificaciones o una viscosidad menor según se determina por el método descrito en el Ejemplo 1. Sin modificaciones significa que el valor medido, que es el promedio de tres repeticiones, está comprendido dentro de dos desviaciones estándar del valor medido para una muestra de trigo sin la adición de xilanasas.

La viscosidad se puede medir usando los siguientes dispositivos: Rapid ViscoAnalyzer (RVA) (por ejemplo, en el procesamiento de bioetanol) y el viscosímetro Haake VT550 (Thermofisher) (por ejemplo, en el procesamiento del almidón del gluten de trigo). Ambos dispositivos pueden controlar los perfiles de viscosidad de los procedimientos de etanol combustible y procedimientos de separación del almidón de trigo, para los cuales las condiciones experimentales se ilustran en los Ejemplos 6 y 7, respectivamente.

En la presente invención, una reducción en la viscosidad puede calcularse comparando una muestra que comprende la xilanasas de la presente invención (o que se ilustra aquí) en comparación con otra muestra comparable sin la xilanasas de la presente invención (o que se ilustra aquí).

La comparación de los perfiles de la reducción de viscosidad de la xilanasas de la presente invención con aquellos de la o las xilanasas de referencia comerciales demuestra el rendimiento de la enzima. El objetivo es mejorar el

rendimiento de la enzima en comparación con la referencia comercial. La o las enzimas de referencia para las aplicaciones individuales se proporcionan en los ejemplos más abajo.

La enzima de referencia para comparar la reducción de la viscosidad en aplicaciones de pienso puede ser Econase®XT.

Un ejemplo de una xilanasa usada en la industria del bioetanol es Xylathin™.

Un ejemplo de una xilanasa usada en la industria de separación del almidón del gluten de trigo es Shearzyme™.

La enzima de referencia para el análisis de la termoestabilidad puede ser la xilanasa (esqueleto) parental (por ejemplo, antes de la modificación).

En una realización de la presente invención las xilanasas que se ilustran aquí son reductores de la viscosidad.

Generalmente, el trigo (u otro cereal) primero se muele en seco para separar el salvado y el germen del endospermo, que se muele hasta obtener harina. Esta harina del endospermo se fracciona después adicionalmente a través de un procedimiento de separación del almidón de trigo en varias corrientes de producto de valor comercial variable. El objetivo principal es producir un grado refinado de almidón A, que consiste en gránulos lenticulares grandes de 15-40 µm. La segunda corriente de almidón B consiste en gránulos de almidón menos purificados, que son esféricos y pequeños (1-10 µm). (C.C. Maningat, P.A. Seib, S.D. Bassi, K.S. Woo, G.D. Lasater, capítulo 10 del libro "Starch" (2009) 441-451, *Wheat starch: production, properties, modification and uses*). El almidón de trigo aislado forma la materia prima para la producción de almidón modificado que se puede usar en aplicaciones tanto alimenticias como no alimenticias. El gluten vital es el tercer producto de valor añadido en los procedimientos de separación del trigo. La vitalidad del gluten de trigo aislado se determina por la capacidad para formar redes viscoelásticas, necesarias para la fabricación de pan. El gluten vital encapsula el dióxido de carbono formado en la preparación de masa durante el horneado, y en consecuencia aumenta el volumen del pan. (Anne van der Borgh, Hans Goesaert, Wim S. Veraverbeke, Jan A. Delcour, *Journal of Cereal Science* 41 (2005) 221-237, *Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved*.) Por lo tanto, a menudo se usa para enriquecer harinas para la fabricación de pan, para obtener productos de pan mejorados. Otros mercados para el gluten incluyen como aditivo en productos vegetarianos, carne, pescado o pollo, incluyendo aquellos usados en la industria de los alimentos para mascotas; en cereales para desayuno; o en salsa de soja. Debido a su termoplasticidad y propiedades filmógenas adecuadas, el gluten se usa también en los mercados no alimenticios como adhesivos. (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey, C.W. Wrigley, *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 82-90, *Wheat-gluten uses and industry needs*.).

Las xilanasas modificadas ilustradas aquí se pueden usar para reducir la viscosidad (o no aumentar la viscosidad) en procedimientos para separar harina de cereales (por ejemplo, harina de trigo, avena, centeno o cebada) en fracciones de almidón y gluten, y para mejorar la separación la degradando oligosacáridos que obstaculizan la aglomeración del gluten.

La viscosidad del mosto y la viscosidad de la pasta de cebada y la malta de cebada en la elaboración de cerveza y malta pueden causar desventajas significativas durante la elaboración de cerveza y/o malta. La presente invención se refiere a la reducción de la viscosidad (o el no aumento de la viscosidad) del mosto, la pasta de cebada, la malta de cebada, o una combinación de los mismos.

## PIENSO O ALIMENTO PARA ANIMALES

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, o composición de aditivo para pienso como se describe aquí, se puede usar como -o en la preparación de- un pienso.

El término "pienso" se usa aquí como sinónimo de "alimento para animales".

Preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano como se describe aquí es un alimento para animales, o un constituyente de un alimento para animales, o un componente para pienso.

El pienso puede estar en forma de una disolución o como un sólido o un semisólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Cuando se usa como -o en la preparación de- pienso, tal como pienso funcional, la enzima o composición como se describe aquí se puede usar junto con uno o más de un portador nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente activo.

La enzima o la composición de aditivo para pienso como se describe aquí se puede mezclar con un componente para pienso para formar un alimento para animales.

5 La expresión "componente para pienso", como se usa aquí, significa todo o parte del alimento para animales. Parte del alimento para animales puede significar un constituyente del alimento para animales o más de un constituyente del alimento para animales, por ejemplo 2 o 3 o 4. En una realización, la expresión "componente para pienso" abarca una premezcla o constituyentes de la premezcla.

10 Preferiblemente, el pienso puede ser un forraje o una premezcla de este, un pienso compuesto o una premezcla de este. En una realización, la composición de aditivo para pienso como se describe aquí puede mezclarse con un pienso compuesto, un componente para pienso compuesto o a una premezcla de un pienso compuesto o a un forraje, un componente de forraje o una premezcla de un forraje.

15 El término "forraje", como se usa aquí, significa cualquier alimento proporcionado a un animal (en lugar de que el animal tenga que buscarlo). Forraje abarca plantas que han sido cortadas.

El término forraje incluye ensilado, piensos comprimidos y peletizados, aceites y raciones mixtas, y también granos germinados y legumbres.

20 El forraje puede obtenerse a partir de una o más de las plantas seleccionadas de: maíz (maíz dulce), alfalfa (Lucerne), cebada, pata de pájaro, brassicas, Chau moellier, col rizada, semilla de colza (canola), colinabo (nabo sueco), nabo, trébol, trébol de Suecia, trébol común, trébol subterráneo, trébol blanco, festuca, bromus, mijo, avena, sorgo, haba de soja, árboles (brotes de árboles podados para heno de árboles), trigo, y legumbres.

25 La expresión "pienso compuesto" significa un pienso comercial en forma de una harina, un pelete, nueces, torta, o un budín. Los piensos compuestos pueden ser una combinación de varias materias primas y aditivos. Estas combinaciones se formulan según los requisitos específicos del animal diana.

30 Los piensos compuestos pueden ser piensos completos que proporcionan todos los nutrientes requeridos diariamente, productos concentrados que proporcionan una parte de la ración (proteína, energía), o suplementos que sólo proporcionan micronutrientes adicionales, tales como minerales y vitaminas.

35 Los ingredientes principales usados en el pienso compuesto son los granos para pienso, que incluyen maíz, trigo, harina de canola, harina de colza, altramu, habas de soja, sorgo, avena, y cebada.

40 Adecuadamente, una premezcla como se menciona aquí puede ser una composición compuesta de microingredientes tales como vitaminas, minerales, conservantes químicos, antibióticos, productos de fermentación, y otros ingredientes esenciales. Las premezclas son habitualmente composiciones adecuadas para amasar en raciones comerciales.

45 Cualquier alimento para animales como se describe aquí puede comprender uno o más materiales para pienso seleccionados del grupo que comprende a) cereales, tales como granos pequeños (por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avena, triticale y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes tales como maíz o sorgo; b) subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, torta húmeda (particularmente torta húmeda a base de maíz), granos secos de destilería (DDG) (particularmente granos secos de destilería a base de maíz (cDDG)), materia soluble de granos secos de destilería (DDGS) (particularmente materia soluble de granos secos de destilería a base de maíz (cDDGS)), salvado de trigo, acemite de trigo, moyuelos de trigo, salvado de arroz, cáscara de arroz, cáscara de avena, pepita de palma, y pulpa de cítricos; c) proteína obtenida de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramu, guisantes, habas, algodón, canola, harina de pescado, proteína de plasma seco, harina de carne y huesos, proteína de patata, suero de leche, copra, sésamo; d) aceites y grasas de origen vegetal y animal; e) minerales y vitaminas.

50 Como se describe aquí, el alimento para animales puede comprender o consistir en maíz, DDGS (tal como cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de los mismos.

55 Como se describe aquí, el componente de pienso puede ser maíz, DDGS (por ejemplo, cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de los mismos.

60 Como se describe aquí, el alimento para animales puede comprender o consistir en maíz, DDGS (tal como cDDGS), o una combinación de los mismos.

Como se describe aquí, el componente de pienso puede ser maíz, DDGS (tal como cDDGS) o una combinación de los mismos.

65 Un alimento para animales como se describe aquí puede contener al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 % o al menos 60 % en peso de maíz y harina de soja o maíz y soja rica en grasa, o harina de trigo o harina de girasol.

Un alimento para animales como se describe aquí puede contener entre alrededor de 5 y alrededor de 40 % de DDGS de maíz. Para aves de corral, el alimento para animales puede contener en promedio entre alrededor de 7 y 15 % de DDGS de maíz. Para el ganado porcino (cerdos), el alimento para animales puede contener en promedio 5 a 40 % de DDGS de maíz.

Un alimento para animales como se describe aquí puede contener maíz como un solo grano, en cuyo caso el alimento para animales puede comprender entre alrededor de 35 % y alrededor de 80 % de maíz.

En alimentos para animales que comprenden granos mixtos, por ejemplo que comprenden maíz y trigo, por ejemplo, el alimento para animales puede comprender al menos 10 % de maíz.

Además o alternativamente, un alimento para animales como se describe aquí puede comprender al menos un material para pienso rico en fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material para pienso rico en fibra, para proporcionar un alimento para animales rico en fibra. Los ejemplos de materiales para pienso ricos en fibra incluyen: trigo, cebada, centeno, avena, subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, pienso de gluten de maíz, torta húmeda, granos secos de destilería (DDG), materia soluble de granos secos de destilería (DDGS), salvado de trigo, acemite de trigo, moyuelos de trigo, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, pepita de palma, y pulpa de cítricos. Algunas fuentes de proteínas pueden considerarse ricas en fibra: proteína obtenida de fuentes tales como girasol, altramuza, habas y algodón.

El alimento para animales como se describe aquí puede comprender al menos un material rico en fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material para pienso rico en fibra seleccionado del grupo que consiste en materia soluble de granos secos de destilería (DDGS), particularmente cDDGS, torta húmeda, granos secos de destilería (DDG), particularmente cDDG, salvado de trigo, y trigo, por ejemplo.

El alimento para animales como se describe aquí puede comprender al menos un material rico en fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material para pienso rico en fibra seleccionado del grupo que consiste en materia soluble de granos secos de destilería (DDGS), particularmente cDDGS, salvado de trigo, y trigo, por ejemplo.

Como se describe aquí, el pienso puede ser uno o más de los siguientes: un pienso compuesto y premezcla, que incluye peletes, nueces o torta (ganado); un cultivo o residuos de cultivos: maíz, soja, sorgo, avena, cebada, copra, paja, cascarillas, residuos de remolacha azucarera; harina de pescado; harina de carne y de hueso; melazas; torta de aceite y torta de prensa; oligosacáridos; plantas forrajeras conservadas: ensilado; algas; semillas y granos, enteros o preparados mediante compresión, molienda, etc.; granos germinados y legumbres; extracto de levadura.

El término "pienso" como se describe aquí abarca en algunas realizaciones alimentos para mascotas. Un alimento para mascotas es un material vegetal o animal previsto para el consumo por mascotas, tal como alimento para perros o alimento para gatos. El alimento para mascotas, tal como el alimento para perros y gatos, puede estar en una forma seca, tal como alimento granulado para perros, o en forma de alimento húmedo enlatado. Los alimentos para gatos pueden contener el aminoácido taurina.

El término "pienso" como se describe aquí abarca en algunas realizaciones alimento para peces. Un alimento para peces contiene normalmente macronutrientes, oligoelementos y vitaminas necesarios para mantener a los peces en cautiverio en un buen estado de salud. El alimento para peces puede estar en forma de una escama, pelete o comprimido. Las formas peletizadas, algunas de las cuales se sumergen rápidamente, se utilizan a menudo para peces más grandes o para especies que se alimentan en el fondo. Algunos alimentos para peces también contienen aditivos tales como beta-caroteno u hormonas sexuales, para mejorar artificialmente el color de los peces ornamentales.

El término "pienso" como se describe aquí abarca en algunas realizaciones alimento para pájaros. El alimento para pájaros incluye alimento que se usa tanto en comederos para aves como para alimentar aves domésticas. Típicamente, el alimento para pájaros comprende diversas semillas, pero también puede incluir sebo (grasa de vacuno o cordero).

Como se usa aquí, la expresión "en contacto" se refiere a la aplicación indirecta o directa de la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención al producto (por ejemplo, pienso). Los ejemplos de los métodos de aplicación útiles incluyen, pero no se limitan a, tratamiento del producto en un material que comprende la composición de aditivo para pienso, la aplicación directa mediante el mezclado de la composición de aditivo para pienso con el producto, el rociado de la composición de aditivo para pienso sobre la superficie del producto, o la inmersión del producto en una preparación de la composición de aditivo para pienso.

La composición de aditivo para pienso como se describe aquí puede mezclarse preferiblemente con el producto (por ejemplo alimento para animales). Alternativamente, la composición de aditivo para pienso puede incluirse en la emulsión o en los ingredientes brutos de un alimento para animales.



Para algunas aplicaciones, es importante que la composición esté disponible sobre o en la superficie de un producto que se modificará/tratará. Esto permite que la composición imparta una o más de las siguientes características favorables: beneficios de rendimiento.

5 La enzima modificada (o composición que comprende la enzima modificada) de la presente invención puede aplicarse para entremezclar, recubrir y/o impregnar un producto (por ejemplo, alimento para animales o ingredientes brutos de un alimento para animales) con una cantidad controlada de esa enzima.

10 En una realización particularmente preferida, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se homogeneiza para producir un polvo.

En una realización preferida alternativa, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se formula hasta formar gránulos como se describe en el documento WO2007/044968 (mencionados como gránulos TPT) o los documentos WO1997/016076 o WO1992/012645.

15 Como se describe aquí, cuando la composición de aditivo para pienso se formula en gránulos, los gránulos pueden comprender una sal de barrera hidratada aplicada como recubrimiento sobre el núcleo de la proteína. La ventaja de ese recubrimiento de sal es una mayor tolerancia térmica, mayor estabilidad en el almacenamiento y protección contra otros aditivos para pienso que de otra forma tienen un efecto adverso sobre la enzima.

Preferiblemente, la sal utilizada para el recubrimiento de sal tiene una actividad en agua mayor que 0,25 o una constante de humedad mayor que 60 % a 20 °C.

25 Preferiblemente, el recubrimiento de sal comprende Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El método como se describe aquí para preparar una enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención puede comprender también la etapa adicional de peletizar el polvo. El polvo puede mezclarse con otros componentes conocidos en la técnica. Es posible forzar el polvo o la mezcla que comprende el polvo a través de una matriz, y las hebras resultantes se cortan en peletes adecuados de longitud variable.

Opcionalmente, la etapa de peletización puede incluir un tratamiento con vapor de agua o una fase de acondicionamiento, antes de la formación de los peletes. La mezcla que comprende el polvo se puede colocar en un acondicionador, por ejemplo un mezclador con inyección de vapor de agua. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura específica, tal como de 60-100 °C; las temperaturas típicas serían 70 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C o 95 °C. El tiempo de permanencia puede variar de segundos a minutos, e incluso horas. Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

40 Se entiende que la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención es adecuada para añadir a cualquier material para pienso apropiado.

El experto en la técnica entenderá que los distintos animales requieren alimentos para animales diferentes, e incluso el mismo animal puede requerir alimentos para animales diferentes en función del propósito para el cual se cría el animal.

Opcionalmente, el alimento para animales puede contener también minerales adicionales tales como, por ejemplo, calcio y/o vitaminas adicionales.

50 Preferiblemente, el alimento para animales es una mezcla de harina de haba de soja y maíz.

Preferiblemente, el pienso no es un alimento para mascotas.

Se describe aquí un método para producir un alimento para animales. El alimento se produce típicamente en molinos de pienso en los cuales primero se trituran las materias primas hasta un tamaño de partícula adecuado, y después se mezclan con los aditivos apropiados. Después, el alimento se puede producir en forma de un producto macerado o peletes; estos últimos implican típicamente un método por el cual la temperatura se eleva hasta un nivel diana, y después, el alimento se hace pasar a través de una troquel para producir peletes de un tamaño específico. Los peletes se dejan enfriar. Posteriormente, puede añadirse aditivos líquidos, tales como grasa y enzima. La producción de alimento para animales también puede implicar una etapa adicional que incluye la extrusión o expansión antes de la peletización, particularmente por medio de técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor de agua.

El alimento para animales puede ser un alimento para un animal monogástrico, tal como aves de corral (por ejemplo, pollo de granja, gallina ponedora, pollos de engorde, pavo, pato, ganso, ave acuática) y cerdos (todas las categorías de edad), un rumiante, tal como ganado vacuno (por ejemplo, vacas o toros (incluyendo terneros)),

caballos, ovejas, una mascota (por ejemplo, perros, gatos) o peces (por ejemplo, peces no gástricos, peces gástricos, peces de agua dulce, tales como salmón, bacalao, trucha y carpa, por ejemplo carpa koi, peces marinos, tales como róbalo, y crustáceos tales como langostinos, mejillones y vieiras). Preferiblemente, el alimento para animales es para aves de corral.

## **ALIMENTO PARA ANIMALES A BASE DE MAÍZ**

Como se describe aquí, el alimento para animales puede ser un alimento para animales a base de maíz. La expresión "alimento para animales a base de maíz", como se usa aquí, significa un alimento para animales que comprende o consiste en maíz (maíz dulce) o un subproducto de maíz.

Preferiblemente, el alimento para animales a base de maíz comprende maíz o un subproducto de maíz como constituyente principal. Por ejemplo, el alimento para animales a base de maíz puede comprender al menos 35 % de maíz o un subproducto de maíz, tal como al menos 40 % de maíz o un subproducto de maíz, tal como al menos 50 % de maíz o un subproducto de maíz, tal como al menos 60 % de maíz o un subproducto de maíz, tal como al menos 70 % de maíz o un subproducto de maíz, tal como al menos 80 % de maíz o un subproducto de maíz, tal como al menos 90 % de maíz o un subproducto de maíz, por ejemplo 100 % de maíz o un subproducto de maíz.

En algunas realizaciones, el alimento para animales a base de maíz puede comprender maíz o un subproducto de maíz como constituyente minoritario; en cuyo caso el alimento para animales puede complementarse con maíz o un subproducto de maíz. Como ejemplo solamente, el alimento para animales puede comprender por ejemplo trigo complementado con maíz o un subproducto de maíz.

Cuando el maíz o el subproducto de maíz es un constituyente minoritario del alimento para animales, el maíz o subproducto de maíz es al menos 5 %, preferiblemente al menos 10 %, preferiblemente al menos 20 %, preferiblemente al menos 30 % del alimento para animales.

Para evitar dudas, el término "maíz", como se usa aquí, es sinónimo de maíz dulce, por ejemplo, *Zea mays*.

En una realización, el subproducto de maíz puede ser materia soluble de granos secos de destilería (cDDGS) de maíz, o torta húmeda de maíz, o granos secos de destilería (DDG) de maíz, o harina de gluten de maíz, o pienso de gluten de maíz o combinaciones de los mismos.

Preferiblemente, el material que contiene arabinosilano como se describe aquí comprende un subproducto de maíz, tal como materia soluble de granos secos de destilería (cDDGS) de maíz o torta húmeda de maíz o granos secos de destilería (DDG) de maíz o harina de gluten de maíz o pienso de gluten de maíz o combinaciones de los mismos.

## **ALIMENTO PARA ANIMALES A BASE DE TRIGO**

Como se describe aquí, el alimento para animales puede ser un alimento para animales a base de trigo. La expresión "alimento para animales a base de trigo", como se usa aquí, significa un alimento para animales que comprende o consiste en trigo o un subproducto de trigo.

Preferiblemente, el alimento para animales a base de trigo comprende trigo o un subproducto de trigo como constituyente principal. Por ejemplo, el alimento para animales a base de trigo puede comprender al menos 40 % de trigo o un subproducto de trigo, tal como al menos 60 % de trigo o un subproducto de trigo, tal como al menos 80 % o un subproducto de trigo, tal como al menos 90 % de trigo o un subproducto de trigo, por ejemplo 100 % de trigo o un subproducto de trigo.

En algunas realizaciones, el alimento para animales a base de trigo puede comprender trigo o un subproducto de trigo como constituyente minoritario; en cuyo caso el alimento para animales puede complementarse con trigo o un subproducto de trigo. Sólo como ejemplo, el alimento para animales puede comprender, por ejemplo, trigo complementado con trigo o un subproducto de trigo.

Cuando el trigo o el subproducto de trigo es un constituyente minoritario del alimento para animales, el trigo o subproducto de trigo es al menos 5 %, preferiblemente al menos 10 %, preferiblemente al menos 20 %, preferiblemente al menos 30 % del alimento para animales.

En una realización, el subproducto de trigo puede ser salvado de trigo, acemite de trigo, fibras de trigo, por ejemplo.

El salvado es la capa externa dura del grano, y consiste en una combinación de aleurona y pericarpio. Junto con el germen, es una parte integral de los granos enteros, y a menudo se produce como un subproducto de la molienda en la producción de granos refinados. Cuando el salvado se extrae de los granos, los granos pierden una parte de su valor nutricional. El salvado está presente en y puede molerse de cualquier grano de cereal, incluyendo arroz,

maíz (maíz dulce), trigo, avena, cebada y mijo. El salvado es particularmente rico en fibra dietaria y ácidos grasos esenciales, y contiene grandes cantidades de almidón, proteína, vitaminas y minerales dietarios.

El acemite de trigo consiste en partículas gruesas y finas de salvado de trigo y partículas finas de moyuelos de trigo, germen de trigo, harina de trigo y los residuos de "cola del molino".

El acemite de trigo es un subproducto económico intermedio entre el alimento para seres humanos y el pienso para animales. Preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano como se describe aquí comprende salvado de trigo y/o acemite de trigo.

#### **TORTA HÚMEDA, GRANOS SECOS DE DESTILERÍA (DDG) Y MATERIA SOLUBLE DE GRANOS SECOS DE DESTILERÍA (DDGS)**

La torta húmeda, los granos secos de destilería y la materia soluble de granos secos de destilería son productos obtenidos después de la eliminación de alcohol etílico por medio de destilación a partir de la fermentación de levadura de un grano o una mezcla de granos por métodos empleados en la industria de la destilación de granos.

Los residuos de destilación que provienen de la destilación (por ejemplo, que comprenden agua, restos del grano, células de levadura, etc.) se separan en una parte "sólida" y una parte líquida.

La parte sólida se denomina "torta húmeda", y se puede como tal como pienso para animales.

La parte líquida se evapora (parcialmente) en un jarabe (materia soluble).

Cuando la torta húmeda se seca, constituye los granos secos de destilería (DDG).

Cuando la torta húmeda se seca junto con el jarabe (materia soluble), constituye granos secos de destilería con materia soluble (DDGS).

La torta húmeda se puede utilizar en operaciones lácteas y en lotes de engorde de ganado vacuno.

Los DDGS secos se pueden utilizar en piensos para ganado, por ejemplo lechero, vacuno y porcino) y piensos para aves de corral.

Los DDGS de maíz son una fuente muy adecuada de proteínas para las vacas lecheras.

#### **HARINA DE GLUTEN DE MAÍZ**

En un aspecto, el subproducto de maíz puede ser harina de gluten de maíz (CGM).

CGM es un subproducto en polvo de la industria de la molienda del maíz. CGM tiene utilidad, por ejemplo, en piensos. Se puede utilizar como una fuente de proteínas económica para pienso, tal como alimento para mascotas, pienso para ganado y pienso para aves de corral. Es una fuente especialmente adecuada del aminoácido cisteína, pero debe equilibrarse con otras proteínas para lisina.

#### **COMPOSICIÓN DE ADITIVO PARA PIENSO**

La composición de aditivo para pienso como se describe aquí y/o el alimento para animales que la comprende se pueden utilizar en cualquier forma adecuada.

La composición de aditivo para pienso como se describe aquí se puede utilizar en la forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de estas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos ruminales, cápsulas, peletes, comprimidos, polvos finos, y gránulos que pueden ser humectables, secados por aspersión o liofilizados. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas.

En algunas aplicaciones, las composiciones de aditivo para pienso como se describen aquí pueden mezclarse con pienso o administrarse en el agua para beber.

Se describe aquí a un método para preparar una composición de aditivo para pienso, que comprende mezclar una xilanasas como se ilustra aquí con un portador, diluyente o excipiente aceptable para pienso, y (opcionalmente) envasar.

## PREMEZCLA

El alimento para animales y/o la composición de aditivo para pienso pueden combinarse con al menos un mineral y/o al menos una vitamina. Las composiciones derivadas de esta manera pueden mencionarse aquí como una premezcla.

### 5 ELABORACIÓN DE CERVEZA Y MALTA

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se pueden usar en la elaboración de cerveza y malta.

Los granos de cebada contienen 1,7 a 4,1 % (p/p) de sustancias extraíbles en agua, y 3,6 a 6,4 % (p/p) de betaglucano total (Anderson, M.A., Cook, J.A., y Stone, B.A., Journal of the Institute of Brewing, 1978, 84, 233-239; Henry, J., Journal of the Science of Food and Agriculture, 1985, 36, 1243).

Los granos de trigo contienen de 0,1 a 0,8 % (p/p) de sustancias extraíbles en agua, y 0,6 a 1,4 % (p/p) de betaglucano total (Anderson, M.A. et al (1978), más arriba).

La hidrólisis eficaz de los arabinoxilanos (AXsol) y beta-glucano es importante ya que tales compuestos pueden estar involucrados en los problemas de producción, tales como la viscosidad del mosto (Ducroo, P. y Frelon, P.G., Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Zurich, 1989, 445; Vietor, R.J. y Voragen, A.G.J., Journal of the Institute of Brewing, 1993, 99, 243) y la capacidad de filtración y formación de turbidez (Coote, N. y Kirsop, B.H. 1976., Journal of the Institute of Brewing, 1976, 82, 34; Izawa, M., Kano, Y. y Kanimura, M. 1991. Proceedings Aviemore Conference on Malting, brewing and Distilling, 1990, 427).

La presente invención proporciona un método para hidrolizar arabinoxilanos (por ejemplo, AXinsol y AXsol) durante la elaboración de cerveza y malta, en el que los granos de trigo, los granos de cebada o una combinación de los mismos, o porciones de los granos de trigo y/o cebada, se mezclan con la xilanasa modificada de la presente invención.

En un aspecto, la presente invención describe una composición alimenticia que es una bebida, que incluye, pero no se imita a, una bebida fermentada tal como cerveza y vino, que comprende una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención.

En otro aspecto, la presente invención describe una composición alimenticia que es una bebida, que incluye, pero no se imita a, una bebida fermentada tal como cerveza y vino, que comprende una xilanasa modificada según la presente invención.

En el contexto de la presente invención, la expresión "bebida fermentada" comprende cualquier bebida producida por un método que comprende un procedimiento de fermentación, tal como una fermentación microbiana, tal como una fermentación bacteriana y/o de levadura.

En un aspecto de la invención, la bebida fermentada es cerveza. Se pretende que el término "cerveza" comprenda cualquier mosto fermentado producido por fermentación/elaboración de cerveza con un material vegetal que contiene almidón. A menudo, la cerveza se produce a partir de malta o un adyuvante, o cualquier combinación de malta y un coadyuvante como material vegetal que contiene almidón. Como se usa aquí, se entiende que el término "malta" se refiere a cualquier grano de cereal malteado, tal como trigo o cebada malteados.

Como se usa aquí, la expresión "material asociado" se refiere a cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar que no es malta, tal como malta de cebada o de trigo. Como ejemplos de adyuvantes, se pueden mencionar materiales tales como granos de maíz común, granos de maíz refinado, levadura de cerveza molida, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarada, trigo, almidón de trigo, cereal tostado, copos de cereales, centeno, avena, maíz (maíz dulce), patata, tapioca, mandioca y jarabes, tales como el jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertida, jarabes de cebada y/o trigo, y similares, que se pueden utilizar como fuente de almidón.

Como se usa aquí, la expresión "producto macerado" se refiere a una suspensión acuosa de cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, tal como una molienda, por ejemplo que comprende malta de cebada aplastada, cebada aplastada, y/u otro adyuvante, o una combinación de los mismos, mezclada con agua que más tarde se separará en mosto y granos agotados.

Como se usa aquí, el término "mosto" se refiere al licor no fermentado que queda después de extraer la molienda durante el macerado.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para preparar una bebida fermentada, tal como una cerveza, que comprende mezclar la xilanasa modificada de la presente invención con malta o un adyuvante.

Los ejemplos de cervezas comprenden: cerveza totalmente malteada, cerveza fabricada según la "Reinheitsgebot", ale, IPA, lager, bitter, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, casi cerveza, cerveza liviana, cerveza con bajo contenido de alcohol, cerveza baja en calorías, porter, cerveza bock, stout, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol, y similares, pero también bebidas alternativas de cereal y malta tales como bebidas de malta aromatizadas con frutas, por ejemplo aromatizadas con cítricos, tales como bebidas de malta con sabor a limón, naranja, lima o bayas, bebidas de malta aromatizadas con licores, por ejemplo licor de malta aromatizado con vodka, ron o tequila, o bebidas de malta aromatizadas con café, tales como licor de malta aromatizado con cafeína, y similares.

## **DESCOMPOSICIÓN DE MATERIAL A BASE DE GRANO, POR EJEMPLO PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES**

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención (o composición que comprende la enzima), se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol durante el procesamiento de granos, por ejemplo a partir de material a base de grano. El material a base de grano puede ser granos enteros (por ejemplo, granos de trigo, cebada, centeno, triticale o maíz enteros o mezclas de los mismos) o porciones de los granos enteros o mezclas de los mismos.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención (o composición que comprende la enzima), se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol en materiales a base de grano o granos enteros.

Para evitar dudas, los granos enteros pueden romperse mecánicamente.

El material a base de grano puede descomponerse o degradarse hasta glucosa. La glucosa se puede utilizar posteriormente como una materia prima para cualquier procedimiento de fermentación, por ejemplo para la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) y/o la producción de compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica).

El material a base de grano puede ser materia prima para un procedimiento de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

Actualmente, la mayor parte del etanol combustible se produce a partir de grano de maíz (maíz dulce), que se muele o tritura, se trata con enzimas amilasas para hidrolizar almidón a azúcares, se fermenta, y se destila. Si bien se ha realizado un progreso sustancial en la reducción de costes de la producción de etanol, persisten desafíos sustanciales. Aún se requieren técnicas mejoradas para reducir el coste de las materias primas de biocombustibles para la producción de etanol. Por ejemplo, en la producción de etanol a base de grano la degradación de los arabinoxilanos puede aumentar la accesibilidad del almidón.

La presente invención proporciona una xilanasa modificada de la presente invención para uso en la descomposición de hemicelulosas, por ejemplo arabinoxilano, particularmente, AXinsol y AXsol.

Solamente como ejemplo, en la industria del alcohol combustible en Europa, los granos pequeños, como el trigo, cebada y centeno, son materias primas comunes; en los Estados Unidos se utiliza principalmente el maíz. El trigo, cebada y centeno contienen, junto al almidón, niveles altos de polímeros de polisacáridos no amiláceos (NSP), como celulosa, beta-glucano y hemicelulosa.

La razón a la cual los NSP diferentes están representados difieren para cada materia prima. La siguiente tabla muestra las distintas cantidades de NSP en trigo, cebada y centeno en comparación con algunas otras materias primas.

Tabla 1: Polisacáridos no amiláceos presentes en materias primas diferentes (g kg<sup>-1</sup> de materia seca)

	Maíz	Trigo	Centeno	Cebada		Avenas	
				Con cáscara	Sin cáscara	Con cáscara	Sin cáscara
Beta-Glucano	1	8	16	42	42	28	41
Celulosa	22	17-20	15-16	43	10	82	14
NCP soluble y no soluble <sup>1</sup>	75	89-99	116-136	144	114	150	113
NSP total	97	107-119	132-152	186	124	232	116

<sup>1</sup> Polisacáridos no celulósicos: pentosanos, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas

5 Los NSP pueden proporcionar una viscosidad alta a los productos macerados de granos. La viscosidad alta tiene un impacto negativo en la producción de etanol, ya que limitará la concentración de sólidos que se puede utilizar en la formación del producto macerado y reducirá la eficacia de la energía del procedimiento. Además, las hemicelulosas residuales presentes durante el procedimiento pueden contribuir a la contaminación en cambiadores de calor y equipos de destilación. El mayor impacto de una alta viscosidad se observa cuando un producto  
10 macerado se enfría hasta la temperatura de fermentación (32 °C). Esto explica la necesidad de reducir la viscosidad en algún momento del procedimiento antes de la etapa de enfriamiento.

Se describe aquí un método para degradar material a base de grano, que comprende mezclas la xilanasa modificada como se describe aquí tan pronto como sea posible en el procedimiento de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol), por ejemplo preferiblemente durante el mezclamiento del material a base de grano al inicio del procedimiento. Una ventaja de añadir las xilanasas modificadas como se describe aquí en una fase temprana en el procedimiento consiste en que las enzimas descomponen la viscosidad inicial.

Se describe aquí, el método para degradar un material a base de grano puede comprender mezclar la xilanasa modificada como se describe aquí antes o durante la licuefacción, sacarificación, fermentación, sacarificación y fermentación simultáneas, post-fermentación o una combinación de las mismas.

Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a la reducción de la viscosidad cuando se degradan materiales a base de grano, por ejemplo en procedimientos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

Los beneficios de utilizar la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y que se ilustra aquí, para reducir la viscosidad cuando se degradan materiales a base de grano, por ejemplo en procedimientos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) son múltiples:

- Se puede usar una producto macerado de sustancia más seca en el procedimiento
- Puede obtenerse un jarabe final con un contenido de sólidos más alto
- Mayor transferencia de calor, menor requisito de energía
- Menor ensuciamiento del evaporador, lo que reduce los costes de limpieza
- Mayor producción del etanol final
- Calidad mejorada de los DDGS (subproducto)
- Mejor separación entre la parte sólida y líquida durante la separación de los bagazos (después de la destilación). La viscosidad menor aumenta la eficacia de la separación.

Otra ventaja importante de la presente invención es que el uso de la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención en la producción de biocombustibles puede dar como resultado (sub)productos mejorados a partir de ese procedimiento, tales como torta húmeda, granos secos de destilería (DDG) o materia soluble de granos secos de destilería (DDGS). Por lo tanto, una ventaja de la presente invención consiste en que dado que la torta húmeda, los DDG y los DDGS son (sub)productos de la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol), el uso de la presente invención puede mejorar la calidad de estos (sub)productos. Por ejemplo, los

arabinosilanos en los (sub)productos pueden estar ya disueltos durante el procedimiento de producción de biocombustibles.

# **SEPARACIÓN DEL ALMIDÓN DEL GLUTEN DE CEREAL (POR EJEMPLO, TRIGO)**

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención (o composición que comprende la enzima), de la presente invención o como se describe aquí, se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol durante la separación del gluten y del almidón de trigo.

Después de la separación inicial del salvado de trigo y germen del endospermo, el fraccionamiento de la harina del endospermo de trigo en fracciones de almidón y gluten se aplica industrialmente a gran escala para obtener almidón A de calidad alta y subproductos de almidón B y gluten vital.

El producto de la degradación de la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) en la presente invención es almidón (almidón A de alta calidad).

Además, se producen los subproductos almidón B y gluten vital. Después, cada producto individual se procesa adicionalmente para complementar o modificar las características del producto alimenticio para las necesidades del mercado.

Existen varios procedimientos de separación del trigo utilizados por la industria y descritos en la bibliografía. Estos procedimientos industriales difieren principalmente en las formas de las mezclas de harina y agua presentadas al equipo de fraccionamiento (centrífugo, hidrociclón, o tamiz) o en las condiciones de reacción iniciales como la temperatura y la aplicación de cizallamiento (Abdulahit Sayaslan, Lebensm.-Wiss. U.-Technol 37 (2004) 499-515, Wetmilling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods).

En el método para separar una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) en fracciones de almidón y gluten, el método comprende mezclar una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo), agua y una xilanasa modificada. La harina de cereal, agua y la xilanasa modificada pueden mezclarse simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) y el agua pueden mezclarse antes del mezclado con la xilanasa modificada.

En general, la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) se mezcla en una masa o pasta, con 35 a 63 % de sólidos secos, a temperaturas de ~20-45 °C. Después, la mezcla se procesa de la siguiente manera:

- 1) dejar reposar la mezcla durante un tiempo (~30 minutos), y secuencialmente eliminar el almidón de la mezcla con el uso de un tamiz, centrífuga o hidrociclón para separar la leche de almidón del gluten, o
- 2) aplicar cizallamiento a la mezcla, opcionalmente diluir la mezcla adicionalmente y separar después la harina de trigo mediante un hidrociclón o una centrífuga con decantador de 2 o 3 fases.

La expresión "sólidos secos", como se usa aquí, significa sólidos totales (disueltos y no disueltos) de una suspensión acuosa (en %) en base al peso seco.

En una realización de la presente invención, el método o uso como se reivindica puede incluir las etapas de mezclar harina de trigo para formar una masa o pasta con un contenido de 35 a 63 % de sólidos secos, a una temperatura de alrededor de 20 a alrededor de 45 °C, y separar el almidón del gluten.

El método de la presente invención puede comprender adicionalmente:

- a) dejar reposar la mezcla durante alrededor de 30 minutos, y secuencialmente eliminar el almidón de la mezcla con un tamiz, una centrífuga o un hidrociclón para separar la leche de almidón del gluten; o
- b) aplicar cizallamiento a la mezcla, y opcionalmente diluir la mezcla adicionalmente, separando el almidón del gluten con un hidrociclón o una centrífuga con decantador de 2 o 3 fases.

La presente invención proporciona un método para mejorar la separación del almidón y el gluten por medio de la adición de una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, adecuadamente durante la etapa de mezclado inicial de la harina y el agua en los diversos procedimientos descritos anteriormente utilizados para la separación del almidón de trigo. La separación mejora por la adición de una xilanasa modificada durante la etapa de mezclado inicial debido a la reducción de la viscosidad y la hidrólisis de AXinsol y/o AXsol que interfieren con las partículas de gluten. Al degradar estos poli- y oligosacáridos, se mejora la aglomeración del gluten, y en consecuencia, se mejora la producción de gluten. (S.A. Frederix, C.M. Courtin, J.A. Delcour, J. Cereal

Sci. 40 (2004) 41-49, Substrate selectivity and inhibitor sensitivity affect xylanase functionality in wheat flour gluten-starch separation).

Una ventaja de la presente invención es que genera producciones más altas de almidón A y/o un gluten de mejor calidad (por ejemplo, gluten vital de mejor calidad).

Una ventaja de la presente invención es que mejora la separación del almidón del gluten de trigo.

Una de las formas para evaluar la calidad del gluten es el control de la aglomeración del gluten. Cuando se aplica una cierta cantidad de fricción a través del amasado de la masa o mezclado de la pasta, las partículas de gluten tienden a aglomerarse en partículas más grandes que forman una red polimérica, denominada "gluten vital". El "gluten vital" puede añadirse a los productos alimenticios para mejorar las propiedades de los productos horneados tales como la resistencia de la masa, la vida útil y el volumen del pan (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey and C. W. Wrigley; Wheat-gluten uses and industry needs; Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 82-90).

En la industria panadera, la calidad y cantidad del gluten en la harina de trigo se determina por medio del ensayo estándar ICC núm. 155 (AACC 38-12) con un Glutomatic. En este dispositivo, se forma una masa a partir de la harina de trigo (10,0 g) mezclada con una pequeña cantidad de disolución de NaCl al 2 % (4,2-4,8 ml). Después de 20 segundos de la etapa de mezclado, la masa se amasa continuamente mientras se lava durante 5 minutos con una disolución de NaCl al 2 % a temperatura ambiente (~22 °C) bombeada a través de la copa de mezclado a un caudal de ~70 ml/minuto. Durante esta etapa de lavado, el agua de lavado que contiene almidón se recolecta, y las partículas de gluten forman una bola de gluten dentro del soporte del tamiz del Glutomatic.

La calidad del gluten se determina mediante la evaluación de la aglomeración del gluten. Esto se realiza por medio de centrifugado de la bola de gluten en una centrifuga especial que contiene un tamiz pequeño. Las partículas de gluten que atraviesan este tamiz (gluten pequeño) se pesan, y se determina la cantidad total de gluten. El índice de gluten se calcula mediante (total de gluten húmedo - gluten húmedo pequeño)/total de gluten húmedo. Cuanto mayor es la mejora de la aglomeración del gluten, más pequeña será la fracción de gluten pequeño y mayor el índice de gluten. Un índice de gluten alto, con un valor máximo teórico de 100 %, indica una bola de gluten de calidad alta.

Otro valor para cuantificar la cantidad de gluten es la producción de gluten seco (%). Este valor se calcula dividiendo los gramos de gluten seco total entre la cantidad total de harina seca que se utilizó en el experimento. Cuanto más gluten seco se recupera, mejor es la separación. Este ensayo industrial se encuentra actualmente en adaptación para simular el procedimiento de separación de masa utilizado en la industria.

## DOSIFICACIONES

Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) en el intervalo de alrededor de 500 UX/kg a alrededor de 16.000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), más preferiblemente alrededor de 750 UX/kg de pienso a alrededor de 8000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), preferiblemente alrededor de 1500 UX/kg de pienso a alrededor de 3000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), preferiblemente alrededor de 2000 UX/kg de pienso a alrededor de 2500 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), y aún más preferiblemente alrededor de 1000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) a alrededor de 4000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) a más de alrededor de 500 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente más de alrededor de 600 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente más de alrededor de 700 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente más de alrededor de 800 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente más de alrededor de 900 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente más de alrededor de 1000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente más de alrededor de 2000 UX/kg, adecuadamente más de alrededor de 2500 UX/kg, adecuadamente más de alrededor de 3000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) a una concentración de entre alrededor de 2000 UX/kg y alrededor de 2500 UX/kg.



En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) en una cantidad menor que alrededor de 16.000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente menor que alrededor de 8000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente menor que alrededor de 7000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente menor que alrededor de 6000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente menor que alrededor de 5000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), adecuadamente menor que alrededor de 4000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede estar presente en una composición de aditivo para pienso en el intervalo de alrededor de 100 UX/kg a alrededor de 320.000 UX/kg de la composición, más preferiblemente alrededor de 300 UX/kg de la composición a alrededor de 160.000 UX/kg de la composición, y aún más preferiblemente de alrededor de 500 UX/kg de la composición a alrededor de 50.000 UX/kg de la composición, e incluso más preferiblemente de alrededor de 500 UX/kg de la composición a alrededor de 40.000 UX/kg de la composición.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención está presente en la composición de aditivo para pienso en más de alrededor de 100 UX/kg de la composición, adecuadamente más de alrededor de 200 UX/kg de la composición, adecuadamente más de alrededor de 300 UX/kg de la composición, adecuadamente más de alrededor de 400 UX/kg de la composición, adecuadamente más de alrededor de 500 UX/kg de la composición.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención está presente en la composición de aditivo para pienso en una cantidad menor que alrededor de 320.000 UX/kg de la composición, adecuadamente menor que alrededor de 160.000 UX/kg de la composición, adecuadamente menor que alrededor de 50.000 UX/kg de la composición, adecuadamente menor que alrededor de 40.000 UX/kg de la composición, adecuadamente menor que alrededor de 30.000 UX/kg de la composición.

La actividad xilanasa puede expresarse en unidades de xilanasa (UX) medidas a un pH de 5,0 con AZCL-arabinoxilano (arabinoxilano de trigo reticulado con azurina, por ejemplo comprimidos Xylazyme, Megazyme) como sustrato. La hidrólisis por la *endo*-(1-4)- $\beta$ -D-xilanasa (xilanasa) produce fragmentos coloreados solubles en agua, y la velocidad de liberación de estos (aumento en la absorbancia a 590 nm) puede relacionarse directamente con la actividad enzimática. Las unidades de xilanasa (UX) se determinan con respecto a un patrón de enzima (xilanasa Danisco, disponible de Danisco Animal Nutrition) en condiciones de reacción estándar, que son 40 °C, 5 min de tiempo de reacción en un amortiguador de McIlvaine, pH 5,0.

La actividad xilanasa de la enzima patrón se determina como la cantidad de grupos terminales de azúcares reductores liberados por minuto de un sustrato de avena-espelta-xilano a un pH de 5,3 y 50 °C. Los grupos terminales de azúcares reductores reaccionan con ácido 3,5-dinitrosalicílico, y la formación del producto de reacción puede medirse como el aumento en la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica con respecto a una curva patrón de xilosa (equivalentes de azúcares reductores). Una unidad de xilanasa (UX) es la cantidad de enzima patrón que libera 0,5  $\mu$ moles de equivalentes de azúcares reductores por minuto a un pH de 5,3 y 50 °C.

En una realización, adecuadamente la enzima se clasifica con la clasificación E.C. anterior, y la clasificación E.C. designa una enzima que tiene esa actividad cuando se prueba en el ensayo que se ilustra aquí para determinar 1 UX.

Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en la etapa de mezclamiento de un procedimiento de separación de almidón de trigo en la masa o pasta en el intervalo de alrededor de 0,01 kg/TM de DS de masa o pasta a alrededor de 0,60 kg/TM de DS, más preferiblemente alrededor de 0,05 kg/TM de DS a alrededor de 0,45 kg/TM de DS de masa o pasta, y aún más preferiblemente alrededor de 0,10 kg/TM de DS a alrededor de 0,25 kg/TM de DS de masa o pasta.

En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación del almidón de trigo), la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse en el intervalo de alrededor de 0,019 g/proteína/TM de DS de harina de trigo (que equivale a 0,019 mg/kg de DS) a alrededor de 119 g de proteína/TM de DS de harina de trigo (que equivale a 119 mg/kg de DS - en el que DS significa contenido de sólidos secos y TM significa tonelada métrica).

En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación del almidón de trigo), la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse a alrededor de 1,19 g de proteína/TM de DS de harina de trigo (que equivale a alrededor de 1,19 mg/kg de DS) - en el que DS significa contenido de sólidos secos y TM significa tonelada métrica.

En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación del almidón de trigo), la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse en el intervalo de alrededor de 9 a alrededor de 120.000 unidades/kg de harina de trigo, adecuadamente entre alrededor de 500-2400 unidades/kg de harina de trigo, adecuadamente entre alrededor de 900-1200 unidades/kg de harina de trigo (en el que 1 unidad se define como la cantidad de enzima que se requiere para producir 1 micromol de equivalentes de azúcares reductores de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 4).

En algunas realizaciones (particularmente en la degradación del material a base de grano), la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse en el intervalo de alrededor de 0,29 g/proteína/TM de DS de trigo (que equivale a 0,29 mg/kg de DS) a alrededor de 0290 g/proteína/DS de trigo (que equivale a 290 mg/kg de DS).

En algunas realizaciones (particularmente en la degradación de material a base de grano), la xilanasa puede dosificarse a 2,9 g/proteína/TM de DS de trigo (que equivale a 2,9 mg/kg de DS).

En algunas realizaciones (particularmente en la degradación del material a base de grano), la xilanasa puede dosificarse en el intervalo de alrededor de 22 a alrededor de 285.000 unidades/kg, adecuadamente alrededor de 1100 a alrededor de 5700 unidades/kg, adecuadamente alrededor de 2200 a alrededor de 2850 unidades/kg (en el que 1 unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 4).

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención y/o composición como se describe aquí que comprende la enzima según la presente invención, puede diseñarse para dosificación de una sola vez o puede diseñarse para uso (por ejemplo, alimentación) diario.

La cantidad óptima de la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición como se describe aquí que comprende la enzima que se va a utilizar en la presente invención, dependerá del producto que se vaya a tratar y/o del método de poner en contacto el producto con la composición y/o del uso previsto para la misma.

La cantidad de enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención utilizada en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para ser eficaz.

La cantidad de enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención utilizada en las composiciones debe ser una cantidad suficiente para ser eficaz y mantener su eficacia, por ejemplo para mejorar el rendimiento de un producto para piensos para alimentar animales que contiene dicha composición. Este tiempo para la eficacia debe extenderse hasta al menos el momento de uso del producto (por ejemplo, la composición de aditivo para pienso o el pienso que la contiene).

## FORMULACIÓN

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede formularse como un líquido, un polvo seco o un gránulo.

El polvo seco o los gránulos pueden prepararse por medios conocidos por los expertos en la técnica, tales como un recubridor de lecho fluidizado por rociado superior, rociado de fondo Wurster o mediante granulación en tambor (por ejemplo, granulación de alto cizallamiento), extrusión, recubrimiento en bandeja o en un mezclador de microingredientes.

Para algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede estar recubierta, por ejemplo, encapsulada.

En una realización, el recubrimiento protege la enzima modificada del calor, y puede considerarse un protector térmico.

5 Como se describe aquí, la composición de aditivo para pienso se puede formular hasta un polvo seco o gránulos como se describe en el documento WO2007/044968 (mencionados como gránulos TPT) o en los documentos WO1997/016076 o WO1992/012645.

10 Como se describe aquí, la composición de aditivo para pienso puede formularse en un gránulo para composiciones de pienso que comprenden un núcleo; un agente activo; y al menos un recubrimiento; conservando el agente activo del gránulo al menos 50 % de la actividad, al menos 60 % de la actividad, al menos 70 % de la actividad, al menos 80 % de la actividad después de las condiciones seleccionadas de una o más de a) un procedimiento de peletización del pienso, b) un procedimiento de pretratamiento del pienso calentado por vapor de agua, c) almacenamiento, d) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla no peletizada, y e) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla de base de pienso o una premezcla de pienso que comprende al menos un compuesto seleccionado de minerales traza, ácidos orgánicos, azúcares reductores, vitaminas, cloruro de colina, y compuestos que dan como resultado una mezcla de base de pienso o premezcla de pienso ácidas o alcalinas.

20 Con respecto al gránulo, al menos un recubrimiento puede comprender un material hidratante para humedecer que constituye al menos 55 % p/p del gránulo; y/o al menos un recubrimiento puede comprender dos recubrimientos. Los dos recubrimientos pueden ser un recubrimiento hidratante para humedecer y un recubrimiento de barrera de humedad. En algunas realizaciones, el recubrimiento hidratante para humedecer puede estar entre 25 % y 60 % p/p del gránulo, y el recubrimiento de barrera de humedad puede estar entre 2 % y 15 % p/p del gránulo. El recubrimiento hidratante para humedecer se puede seleccionar de sales inorgánicas, sacarosa, almidón y maltodextrina, y el recubrimiento de barrera de humedad se puede seleccionar de polímeros, gomas, suero y almidón.

25 El gránulo puede producirse usando un procedimiento de peletización del pienso, y el procedimiento de pretratamiento del pienso puede realizarse a una temperatura entre 70 °C y 95 °C durante varios minutos, tal como entre 85 °C y 95 °C.

30 Como se describe aquí, la composición de aditivo para pienso puede formularse hasta un gránulo para pienso para animales que comprende un núcleo; un agente activo; conservando el agente activo del gránulo al menos 80 % de la actividad después del almacenamiento y después de un procedimiento de peletización calentado por vapor de agua en el que el gránulo es un ingrediente; un recubrimiento de barrera de humedad; y un recubrimiento hidratante para humedecer que constituye al menos 25 % p/p del gránulo; teniendo el gránulo una actividad en agua menor que 0,5 antes del procedimiento de peletización calentado con vapor de agua.

40 El gránulo puede tener un recubrimiento de barrera de humedad seleccionado de polímeros y gomas, y el material hidratante para humedecer puede ser una sal inorgánica. El recubrimiento hidratante para humedecer puede estar entre 25 % y 45 % p/p del gránulo, y el recubrimiento de barrera de humedad puede estar entre 2 % y 10 % p/p del gránulo.

45 El gránulo puede producirse con el uso de un procedimiento de peletización calentado por vapor de agua que puede realizarse a una temperatura entre 85 °C y 95 °C durante varios minutos.

En algunas realizaciones, la enzima puede diluirse con el uso de un diluyente, tal como polvo de almidón, caliza, o similares.

50 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima de la presente invención, está en una formulación líquida adecuada para el consumo, preferiblemente tal consumo líquido contiene uno o más de los siguientes: un amortiguador, sal, sorbitol y/o glicerol.

55 En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima, puede formularse mediante la aplicación, por ejemplo, rociado, de la enzima o enzimas sobre un sustrato portador, tal como trigo triturado por ejemplo.

60 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición como se describe aquí que comprende la enzima según la presente invención, puede formularse como una premezcla. Por ejemplo, solamente la premezcla puede comprender uno o más componentes para piensos, tal como uno o más minerales y/o una o más vitaminas.

65 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, para su uso en la presente invención se formula

con al menos un portador fisiológicamente aceptable seleccionado de al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato de calcio), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbato, glicerol, sacarosa, propilenglicol, 1,3-propanodiol, glucosa, parabenos, cloruro de sodio, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.

## ENVASADO

En una realización, se envasa la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición que la comprende (por ejemplo, composición de aditivo para pienso) y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales como se describe aquí.

Como se describe aquí, la composición de aditivo para pienso y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales se puede envasar en una bolsa, tal como una bolsa de papel.

Como se describe aquí, la composición de aditivo para pienso y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales puede estar sellada en un recipiente. Se puede utilizar cualquier recipiente adecuado.

## FORMAS

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima (por ejemplo, la composición de aditivo para pienso) como se describe aquí, y otros componentes y/o el alimento para animales que la comprende, se pueden utilizar de cualquier forma adecuada.

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que la comprende (por ejemplo, la composición de aditivo para pienso) como se describe aquí, se puede utilizar en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de estas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos ruminales, cápsulas, peletes, comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, disoluciones o suspensiones, polvos finos, y gránulos que pueden ser humectables, secados por aspersión o liofilizados. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas.

La composición como se describe aquí que comprende la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, continua, pulsada o controlada.

A modo de ejemplo, si la composición como se describe aquí se usa en un sólido, por ejemplo en forma peletizada, también puede contener uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina; disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos; aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga; también pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Los ejemplos de portadores aceptables nutricionalmente para uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, gelatina de petróleo, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres petroethral de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y similares.

Los excipientes preferidos para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular.

Para suspensiones y/o elixires acuosos, la composición como se describe aquí puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, colorantes o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

## SUJETO

El término "sujeto", como se usa aquí, se refiere a un animal al que se administró o se va a administrar una xilanasa modificada según la presente invención o una composición de aditivo para pienso como se describe aquí o un alimento para animales que comprende esa composición de aditivo para pienso como se describe aquí.

El término "sujeto", como se usa aquí, se refiere a un animal.

En una realización, el sujeto es un mamífero, ave, pez o crustáceo, incluyendo, por ejemplo, ganado o un animal doméstico (por ejemplo, una mascota).

5 En una realización, el "sujeto" es un animal de ganadería.

El término "ganado", como se usa aquí, se refiere a cualquier animal de criadero. Preferiblemente, el ganado es uno o más rumiantes tal como ganado vacuno (por ejemplo, vacas o toros (que incluyen terneros)), animales monogástricos, tales como aves de corral (que incluyen pollos de engorde, gallinas y pavos), cerdos (que incluyen lechones), aves, animales acuáticos tales como peces, peces no gástricos, peces gástricos, peces de agua dulce, tales como salmón, bacalao, trucha y carpa, por ejemplo, carpa Koi, peces de mar, tales como róbalo y crustáceos tales como langostinos, mejillones y vieiras), caballos (que incluyen caballos de carrera), ganado ovino (que incluye corderos).

15 En otra realización, el "sujeto" es un animal domesticado o mascota o un animal mantenido en un zoológico.

Las expresiones "animal domesticado" o "mascota" o "animal mantenido en un zoológico", como se usan aquí, se refieren a cualquier animal relevante que incluye cánidos (por ejemplo, perros), félidos (por ejemplo, gatos), roedores (por ejemplo, conejillos de indias, ratas, ratones), aves, peces (que incluyen peces de agua dulce y de mar), y caballos.

## RENDIMIENTO

25 Como se usa aquí, el "rendimiento del animal" puede determinarse por la eficacia del pienso y/o el aumento de peso del animal y/o por el índice de conversión del pienso y/o por la digestibilidad de un nutriente en un pienso (por ejemplo, digestibilidad del aminoácido) y/o energía digestible o energía metabolizable en un pienso y/o por retención de nitrógeno y/o por la capacidad de los animales para evitar los efectos negativos de la enteritis necrótica y/o por la respuesta inmunitaria del sujeto.

30 Preferiblemente, el "rendimiento del animal" se determina por la eficacia del pienso y/o ganancia de peso del animal y/o por el índice de conversión de pienso.

Por "mayor rendimiento del animal" se entiende que hay una mayor eficacia del pienso y/o mayor aumento de peso y/o un menor índice de conversión del pienso y/o mejor digestibilidad de nutrientes o energía en un pienso y/o por una mejor retención de nitrógeno y/o por una mejor respuesta inmunitaria en el sujeto que resulta del uso de una composición de aditivo para pienso como se describe aquí en el pienso en comparación con el pienso que no comprende esa composición de aditivo para pienso.

40 Preferiblemente, por "mayor rendimiento del animal" se entiende que hay una mayor eficacia del pienso y/o mayor aumento de peso y/o menor índice de conversión del pienso.

Como se usa aquí, el término "eficacia del pienso" se refiere a la cantidad del aumento de peso por unidad de pienso cuando se alimenta al animal ad-libitum o con una cantidad especificada de pienso durante un período de tiempo.

45 Por "mayor eficacia del pienso" se quiere significar que el uso de una composición de aditivo para pienso como se describe aquí en el pienso produce un mayor aumento de peso por unidad de consumo de pienso en comparación con un animal alimentado sin que esa composición de aditivo para pienso esté presente.

## 50 ÍNDICE DE CONVERSIÓN DE PIENSO (ICP)

Como se usa aquí, la expresión "índice de conversión de pienso" se refiere a la cantidad de pienso con que se alimenta a un animal para aumentar el peso del animal en un nivel específico.

55 Un índice de conversión de pienso mejorado significa un menor índice de conversión de pienso.

"Menor índice de conversión de pienso" o "índice de conversión de pienso mejorado" significan que el uso de una composición de aditivo para pienso en el pienso reduce la cantidad de pienso que se debe suministrar a un animal para aumentar el peso del animal en una cantidad especificada en comparación con la cantidad de pienso necesaria para aumentar el peso del animal en la misma cantidad cuando el pienso no comprende esa composición de aditivo para pienso.

## DIGESTIBILIDAD DE LOS NUTRIENTES

65 Como se usa aquí, "digestibilidad del nutriente" se refiere a la fracción de un nutriente que desaparece del tracto gastrointestinal o de un segmento específico del tracto gastrointestinal, por ejemplo el intestino delgado. La

digestibilidad del nutriente se puede medir como la diferencia entre la cantidad administrada al sujeto y la cantidad excretada en las heces del sujeto, o entre la cantidad administrada al sujeto y la cantidad que permanece en la digesta en un segmento específico del tracto gastrointestinal, por ejemplo el íleo.

Como se usa aquí, la digestibilidad del nutriente se puede medir por la diferencia entre la ingesta de un nutriente y el nutriente excretado por medio de la recolección total del excremento durante un periodo de tiempo; o con el uso de un marcador inerte que no se absorbe en el cuerpo del animal y permite que el investigador calcule la cantidad de nutriente que desapareció en todo el tracto gastrointestinal o en un segmento del tracto gastrointestinal. Tal marcador inerte puede ser dióxido de titanio, óxido crómico, o ceniza insoluble en ácido. La digestibilidad se puede expresar como un porcentaje del nutriente en el pienso o como unidades de masa de nutriente digestible por unidades de masa de nutriente en el pienso.

Como se usa aquí, la digestibilidad del nutriente abarca la digestibilidad del almidón, la digestibilidad de la grasa, la digestibilidad de la proteína, y la digestibilidad de los aminoácidos.

Como se usa aquí, la digestibilidad de la energía se refiere a la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta de las heces, o la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta de la digesta restante en un segmento específico del tracto gastrointestinal del animal, por ejemplo el íleo. Como se usa aquí, la energía metabolizable se refiere a la energía metabolizable aparente, y significa la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta contenida en las heces, orina, y productos gaseosos de la digestión. La digestibilidad de la energía y la energía metabolizable pueden medirse como la diferencia entre el consumo de energía bruta y la energía bruta excretada en las heces o la digesta presente en un segmento específico del tracto gastrointestinal, con el uso de los mismos métodos aplicados para medir la digestibilidad de nutrientes, con las correcciones apropiadas para la excreción de nitrógeno con el fin de calcular la energía metabolizable del pienso.

## COMBINACIÓN CON OTROS COMPONENTES

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se puede utilizar combinada con otros componentes.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se puede utilizar combinada con un probiótico o un microbio alimentado directamente (DFM), por ejemplo una bacteria alimentada directamente.

La combinación como se describe aquí comprende la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o una composición que comprende la xilanasa, por ejemplo una composición de aditivo para pienso, y otro componente que es adecuado para el consumo humano o animal y es capaz de proporcionar un beneficio médico o fisiológico al consumidor.

En una realización, el "otro componente" puede ser una o más enzimas adicionales (por ejemplo, otras enzimas de pienso o enzimas de la elaboración de cerveza o malta, o enzimas del procesamiento de granos o enzimas de separación del almidón del gluten de trigo).

Otras enzimas adecuadas para uso en la presente invención pueden ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4); celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91),  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), celulasas (E.C. 3.2.1.74), liquenasas (E.C. 3.1.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), acetiltransferasas lipídicas (clasificadas generalmente como E.C. 2.3.1.x), fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), fitasas (por ejemplo, 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), amilasas, alfa-amilasas (E.C. 3.2.1.1), otras xilanasas (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73), glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3), hemicelulasas, proteasas (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)), enzimas desramificantes, cutinasas, esterases y/o mananasas (por ejemplo, una  $\beta$ -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).

En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso), el otro componente puede ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una amilasa (que incluye  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y  $\gamma$ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)); y/o una proteasa (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una fitasa (por ejemplo, una 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.38)).

En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso), el otro componente puede ser una combinación de una amilasa (por ejemplo,  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1)) y una proteasa (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62)).

En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso), el otro componente puede ser una  $\beta$ -glucanasa, por ejemplo una endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa (E.C. 3.2.1.6).

5 En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso), el otro componente puede ser una fitasa (por ejemplo, una 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.38).

En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso), el otro componente puede ser una mananasa (por ejemplo, una  $\beta$ -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).

10 En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso), el otro componente puede ser una lipasa (E.C. 3.1.1.3), una aciltransferasa lipídica (generalmente clasificada como E.C. 2.3.1.x), o una fosfolipasa (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), adecuadamente una lipasa (E.C. 3.1.1.3).

15 En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso), el otro componente puede ser una proteasa (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)).

20 En una realización, el componente adicional puede ser un estabilizante o un emulsionante o un aglutinante o un portador o un excipiente o un diluyente o un disgregante.

El término “estabilizante”, como se usa aquí, se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (por ejemplo, un producto de pienso) cambie en el tiempo.

25 El término “emulsionante”, como se usa aquí, se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de un pienso) que evita la separación de las emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gotitas contenida dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite en agua, en las que la fase de gotitas o la fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua en aceite, en las que el agua se vuelve la fase dispersa y la fase continua es aceite. Las espumas, que son gas en líquido, y las suspensiones, que son sólido en líquido, pueden también estabilizarse a través del uso de emulsionantes.

30 Como se usa aquí, el término “aglutinante” se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de pienso) que aglutina el producto a través de una reacción física o química. Durante la “gelificación” por ejemplo, el agua se absorbe, y proporciona un efecto aglutinante. Sin embargo, los aglutinantes pueden absorber otros líquidos, tales como aceites, y contenerlos dentro del producto. En el contexto de la presente invención, los aglutinantes se utilizarán típicamente en productos sólidos o de bajo contenido de humedad, por ejemplo productos de horneado, pasteles, rosquillas, pan y otros. Los ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y goma arábica.

40 “Portadores” se refiere a materiales adecuados para la administración de la enzima, e incluye cualquier material conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante, que no es tóxico y que no interactúa con ningún componente de la composición de manera perjudicial.

45 Se describe aquí un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición de aditivo para pienso) que comprende mezclar una enzima de la presente invención con al menos un portador fisiológicamente aceptable seleccionado de al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato de calcio), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbato, glicerol, sacarosa, propilenglicol, 1,3-propanodiol, glucosa, parabenos, cloruro de sodio, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.

50 Los 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.

55 Los ejemplos de “disgregantes” incluyen uno o más de: almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos.

Los ejemplos de “diluyentes” incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

60 Los otros componentes se pueden utilizar simultáneamente (por ejemplo, cuando están juntos en una mezcla, o incluso cuando se suministran por distintas rutas) o secuencialmente (por ejemplo, pueden suministrarse por distintas rutas) a la xilanasas de la presente invención.

65 Preferiblemente, cuando la composición de aditivo para pienso como se describe aquí se mezcla junto con otro u otros componentes, el DFM sigue siendo viable.

Preferiblemente, la composición de aditivo para pienso como se describe aquí no comprende cromo o cromo orgánico

5 Preferiblemente, la composición de aditivo para pienso como se describe aquí no contiene glucanasa.

Preferiblemente, la composición de aditivo para pienso como se describe aquí no contiene ácido sórbico.

#### **AISLADA**

10

En un aspecto, preferiblemente la secuencia de aminoácidos, o el ácido nucleico o la enzima según la presente invención, están en una forma aislada. El término "aislada" significa que la secuencia o la enzima o el ácido nucleico están al menos sustancialmente libres de al menos otro componente con el que la secuencia, la enzima o el ácido nucleico se asocia naturalmente en la naturaleza y como se encuentra de naturaleza. La secuencia, la enzima o el ácido nucleico de la presente invención pueden proporcionarse en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los cuales la sustancia podría asociarse de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, puede estar sustancialmente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

15

20

#### **PURIFICADA**

En un aspecto, preferiblemente la secuencia, la enzima o el ácido nucleico según la presente invención está en una forma purificada. El término "purificada" significa que el componente dado está presente a un alto nivel. El componente es deseablemente el componente predominante presente en una composición. Preferiblemente, está presente a un nivel de al menos alrededor de 90 % o al menos alrededor de 95 % o al menos alrededor de 98 %; estando determinado dicho nivel sobre una base de peso seco/peso seco con respecto a la composición total que se considera.

25

#### **SECUENCIA NUCLEOTÍDICA**

30

Se describen aquí secuencias nucleotídicas que codifican proteínas que tienen las propiedades específicas como se definen aquí.

35

La expresión término "secuencia nucleotídica", como se usa aquí, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tales como porciones de las mismas). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, puede ser bicatenaria o monocatenaria, ya sea que represente la cadena codificante o la cadena antisentido.

40

La expresión "secuencia nucleotídica", con respecto a la presente invención, incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético, y ARN. Preferiblemente significa ADN, más preferiblemente secuencia codificante del ADNc para la presente invención.

En una realización, la expresión "secuencia nucleotídica" significa ADNc.

45

En una realización preferida, la secuencia nucleotídica relacionada con el alcance propio de la invención y abarcada por el alcance *per se* no incluye la secuencia nucleotídica nativa según la presente invención cuando está en su ambiente natural y cuando está vinculada con su o sus secuencias asociadas naturalmente que está o están también en su entorno natural. Para hacer más fácil la referencia, los presentes inventores llamarán a esta realización preferida "secuencia nucleotídica no nativa". En este sentido, la expresión "secuencia nucleotídica nativa" se refiere a una secuencia nucleotídica entera en su ambiente nativo y cuando se enlaza operativamente a un promotor entero con el que se relaciona naturalmente, promotor el cual también se encuentra en su entorno nativo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos comprendida en el alcance de la presente invención puede aislarse y/o purificarse después de la expresión de una secuencia nucleotídica en su organismo nativo. Sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos comprendida en el alcance de la presente invención puede expresarse por medio de una secuencia nucleotídica en su organismo nativo, pero en la que la secuencia nucleotídica no está controlada por el promotor con el cual se asocia naturalmente dentro de ese organismo.

50

55

60

Típicamente, la secuencia nucleotídica comprendida en el alcance de la presente invención se prepara con el uso de técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia nucleotídica podría sintetizarse, completa o parcialmente, con el uso de métodos químicos muy conocidos en la técnica (véase Caruthers MH et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23, y Horn T et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).



## PREPARACIÓN DE LA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA

Una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene las propiedades específicas como se define aquí, o una proteína que es adecuada para su modificación, puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse a partir de cualquier célula u organismo que produce dicha proteína. En la técnica se conocen diversos métodos para identificar y/o aislar y/o purificar secuencias nucleotídicas. A título de ejemplo, se pueden utilizar técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia una vez que se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A título de otro ejemplo, un ADN genómico y/o genoteca de ADNc puede construirse con el uso de ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la enzima. Si se conoce la secuencia de aminoácidos de la enzima, puede sintetizarse y utilizarse sondas oligonucleotídicas marcadas para identificar los clones que codifican enzimas de la genoteca genómica preparada a partir del organismo. Alternativamente, para identificar clones que codifican enzimas se podría utilizar una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen de enzima conocido. En el último caso, se utilizan condiciones de hibridación y lavado de menor rigurosidad.

Alternativamente, los clones que codifican enzimas se podrían identificar insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias sin enzimas con la genoteca de ADN genómica resultante, y después sembrando la bacteria transformada sobre placas con agar que contienen un sustrato para enzimas (es decir, arabinosilano), de manera que se puedan identificar los clones que expresan la enzima.

En otra alternativa adicional, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima puede prepararse sintéticamente con métodos convencionales establecidos, por ejemplo el método de la fosforoamidita descrito por Beaucage S.L. et al., (1981) Tetrahedron Letters 22, pág. 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984) EMBO J. 3, pág. 801-805. En el método de la fosforoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, reasocian, ligan y clonan en vectores adecuados.

La secuencia nucleotídica puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc, o de origen mixto genómico y de ADNc, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según convenga) según técnicas convencionales. Cada fragmento ligado corresponde a diversas partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN también puede prepararse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en la patente de US 4.683.202 o en Saiki R K et al., (Science (1988) 239, pág. 487-491).

## SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

Se describen aquí secuencias de aminoácidos de enzimas que tienen las propiedades específicas como se definen aquí.

Como se usa aquí, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse de una fuente adecuada, o puede obtenerse sintéticamente, o puede prepararse con el uso de técnicas de ADN recombinante.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos relacionada con el alcance *per se* de la invención, y comprendida en ese alcance, no es una enzima nativa. En este sentido, la expresión "enzima nativa" se refiere a una enzima completa que se encuentra en su ambiente nativo, expresada por su secuencia nucleotídica nativa.

## IDENTIDAD DE SECUENCIAS U HOMOLOGÍA DE SECUENCIAS

Se describe aquí el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la o las secuencias de aminoácidos de un polipéptido que tienen propiedades específicas definidas aquí, o de cualquier secuencia nucleotídica que codifica tal polipéptido (mencionadas de aquí en adelante como una o más "secuencias homólogas"). Aquí, el término "homóloga" se refiere a una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácidos en cuestión y las secuencias nucleotídicas en cuestión. Aquí, el término "homología" puede equivaler a "identidad".

Las secuencias de aminoácidos y/o secuencias nucleotídicas homólogas deberían proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o mejora la actividad de la enzima.

En el presente contexto, en algunas realizaciones se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que puede ser al menos 97,7 % idéntica, preferiblemente al menos 98 o 99 % idéntica a la secuencia en cuestión.

En algunas realizaciones, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que puede ser al menos 85 % idéntica, preferiblemente al menos 90 o 95 % idéntica a la secuencia en cuestión.

5 Típicamente, las secuencias homólogas comprenden los mismos sitios activos, etc. que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

10 En una realización, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia nucleotídica que tiene una o varias adiciones, deleciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia en cuestión.

15 En el presente contexto, "la secuencia en cuestión" se refiere a la secuencia nucleotídica o secuencia de polipéptido/aminoácidos según la invención.

Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia polipeptídica se determina mediante el uso de SEQ ID No. 1 como secuencia en cuestión en un alineamiento de secuencias. En una realización, la secuencia polipeptídica en cuestión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia nucleotídica se determina mediante el uso de SEQ ID No. 2 como secuencia en cuestión en el alineamiento de secuencias. En una realización, la secuencia en cuestión para las secuencias nucleotídicas se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

Un "ácido nucleico parental" o "aminoácido parental" significa una secuencia de ácidos nucleicos o una secuencia de aminoácidos, codificante o que codifica el polipéptido parental, respectivamente.

Se describe aquí una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa aquí o una proteína derivada de esta proteína (parental) por sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos se determina en al menos 20 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 30 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 40 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 50 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 60 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 200 aminoácidos contiguos.

Se describe aquí una secuencia de ácido nucleico (o gen) que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa aquí o que codifica una proteína derivada de esta proteína (parental) por sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

En el presente contexto, en una realización se considera que una secuencia homóloga o secuencia foránea incluye una secuencia nucleotídica que puede ser al menos 97,7 % idéntica, preferiblemente al menos 98 o 99 % idéntica, a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia en cuestión).

En otra realización, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia nucleotídica que puede ser al menos 85 % idéntica, preferiblemente al menos 90 o 95 % idéntica a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia en cuestión).

Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc. que la secuencia en cuestión. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

Las comparaciones de homología se pueden realizar a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología o el % de identidad entre dos o más secuencias.

El % de homología o % de identidad puede calcularse en secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia, y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido

correspondiente en la otra secuencia, un resto por vez. Esto se denomina alineamiento "sin espacios". Típicamente, tales alineamientos sin espacios se realizan únicamente en un número relativamente bajo de restos.

Aunque este método es muy simple y consistente, fracasa al tomar en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas, una inserción o una delección harán que los siguientes restos de aminoácidos estén fuera de alineamiento, y esto dará como resultado, potencialmente, una gran reducción en el % de homología o % de identidad cuando se realiza un alineamiento global. Consecuentemente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología total. Esto se logra al insertar "espacios" en el alineamiento de secuencias, para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por espacios" a cada espacio que se produce en el alineamiento, de manera que, para la misma cantidad de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con la cantidad menor de espacios posible -que refleja una relación mayor entre las dos secuencias comparadas- alcanza una puntuación más alta que un alineamiento con muchos espacios. Típicamente, se utiliza "costes de espacios afines", que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un espacio y una penalización menor por cada resto posterior en el espacio. Este es el sistema de puntuación de espacios utilizado más comúnmente. Por supuesto, las penalizaciones por espacios altas producen alineamientos optimizados con menos espacios. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por espacios. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores predeterminados cuando se utiliza un programa para comparaciones de secuencias.

Por lo tanto, el cálculo del % de homología o % de identidad máximo requiere, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo, que tiene en cuenta las penalizaciones por espacios. Un programa informático adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de programas útiles que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase Ausubel et al. 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4.<sup>a</sup> ed - capítulo 18), BLAST 2 (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y [tatiana@ncbi.nlm.nih.gov](mailto:tatiana@ncbi.nlm.nih.gov)), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60), tal como por ejemplo en la herramienta de búsqueda GenomeQuest ([www.genomequest.com](http://www.genomequest.com)).

Aunque el % de homología o % de identidad final se pueden determinar en términos de identidad, el procedimiento de alineamiento en sí no está basado típicamente en una comparación de pares de todo o nada. En cambio, se usa generalmente una matriz graduada de puntuaciones de similitud, que asigna puntuaciones a cada comparación de pares en función de la similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz que se utiliza comúnmente es la matriz BLOSUM62 - la matriz predeterminada para el paquete integrado de programas BLAST. Los programas Vector NTI utilizan generalmente los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizados, si se proporciona (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar los valores predeterminados para el paquete Vector NTI.

Alternativamente, el porcentaje de homología puede calcularse con el uso de la función de alineamientos múltiples en Vector NTI (Invitrogen Corp.), basada en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el programa ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencias. El programa hace esto típicamente como parte de la comparación de secuencias, y genera un resultado numérico.

Si se utilizan las penalizaciones por espacios al determinar la identidad de secuencias, entonces se utilizan preferiblemente los siguientes parámetros para el alineamiento de pares:

PARA BLAST		
APERTURA DE ESPACIO		9
EXTENSIÓN DE ESPACIO		2
PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA
Matriz ponderal	IUB	Gonnet 250
APERTURA DE ESPACIO	15	10
EXTENSIÓN DE ESPACIO	6,66	0,1

En una realización, CLUSTAL se puede utilizar con el conjunto de penalización por espacio y extensión del espacio como se definió anteriormente.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica o secuencia proteica se determina en al menos 20 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 30 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 40 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 50 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 60 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 100 nucleótidos/aminoácidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica se determina en al menos 100 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 200 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 300 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 400 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 500 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 600 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 700 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 800 nucleótidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra aquí.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra aquí como la secuencia madura, por ejemplo SEQ ID No. 2 o SEQ ID No. 24 o SEQ ID No. 25 o SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33. Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia nucleotídica puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra aquí como SEQ ID No. 2.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia proteica (aminoácidos) se determina en al menos 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 200 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 300 aminoácidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteica se puede determinar sobre la secuencia completa que se ilustra aquí.

Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteica se puede determinar sobre la secuencia completa que se ilustra aquí como la secuencia madura, por ejemplo SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5. Adecuadamente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteica se puede determinar sobre la secuencia completa que se ilustra aquí como SEQ ID No. 1.

En el presente contexto, la expresión "secuencia de consulta" significa una secuencia homóloga o una secuencia foránea, que se alinea con una secuencia en cuestión con el fin de ver si está dentro del alcance de la presente invención. Consecuentemente, tal secuencia de consulta puede ser, por ejemplo, una secuencia de la técnica anterior o una tercera secuencia.

En una realización preferida, las secuencias se alinean con un programa de alineamiento global, y la identidad de secuencias se calcula al identificar el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido entre la longitud de la secuencia en cuestión.

En una realización, el grado de identidad de secuencias entre una secuencia de consulta y una secuencia en cuestión se determina 1) alineando las dos secuencias con cualquier programa de alineamiento adecuado usando la matriz de puntuación predeterminada y la penalización por espacio predeterminada, 2) identificando la cantidad de coincidencias exactas, en el que una coincidencia exacta consiste en la identificación por el programa de alineamiento de un aminoácido o un nucleótido idénticos en las dos secuencias alineadas en una posición dada en el alineamiento, y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas entre la longitud de la secuencia en cuestión.

En aún otra realización preferida, el programa de alineamiento global se selecciona del grupo que consiste en CLUSTAL y BLAST (preferiblemente BLAST), y la identidad de secuencia se calcula al identificar el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido entre la longitud de la secuencia en cuestión.

Las secuencias también pueden tener delecciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse en función de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, carácter hidrófilo, y/o naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores similares de hidrofilia incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina, y tirosina.

Las sustituciones conservativas pueden llevarse a cabo, por ejemplo, según la tabla más abajo. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna, pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar - no cargado	C S T M
		N Q
	Polar - cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

La presente invención también abarca la sustitución homóloga ("sustitución" y "reemplazo" se utilizan aquí para indicar el intercambio de un resto de aminoácido existente por un resto alternativo) que puede ocurrir, es decir, la sustitución de igual a igual, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede ocurrir la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de resto por otro, o alternativamente, que implica la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (en lo sucesivo mencionada como Z), ácido diaminobutírico ornitina (en lo sucesivo mencionada como B), norleucina ornitina (en lo sucesivo mencionada como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazos también pueden realizarse con aminoácidos no naturales, que incluyen aminoácidos alfa\* y alfadisustituidos\*, N-alkil aminoácidos\*, ácido láctico\*, derivados haluro de aminoácidos naturales, tales como trifluorotirosina\*, p-Cl-fenilalanina\*, p-Br-fenilalanina\*, p-I-fenilalanina\*, L-alil-glicina\*, β-alanina\*, ácido L-α-aminobutírico\*, ácido L-γ-amino butírico\*, ácido L-α-amino isobutírico\*, ácido L-ε-amino caproico#, ácido 7-amino heptanoico\*, L-metionina sulfona#, L-norleucina\*, L-norvalina\*, p-nitro-L-fenilalanina\*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina\*, derivados metílicos de fenilalanina (Phe), tales como 4-metil-Phe\*, pentametil-Phe\*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metilo)\*, L-Phe (4-isopropilo)\*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilo)\*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)\*. La notación \* se ha utilizado con el fin de la descripción anterior (en relación con la sustitución homóloga o no homóloga) para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, en tanto que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado; #\* indica características anfipáticas.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualquier par de restos de aminoácidos de la secuencia, incluyendo grupos alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de los espaciadores de aminoácidos tales como restos de glicina o de β-alanina. Los expertos en la técnica comprenderán bien una forma adicional de variación que implica la presencia de uno o más restos de aminoácidos en forma peptido. Para evitar dudas, "la forma peptido" se utiliza para referirse a restos de aminoácidos variantes, en los que el grupo sustituyente del carbono α se encuentra en el átomo de nitrógeno del resto en lugar de en el carbono α. Los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptido son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

La xilanasasa para uso como se describe aquí puede comprender una secuencia polipeptídica que se muestra como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, o SEQ ID No. 21 con una sustitución conservativa de al menos uno de los aminoácidos.

Adecuadamente, puede haber al menos 2 sustituciones conservativas, tales como al menos 3 o al menos 4 o al menos 5.

Adecuadamente, puede haber menos de 15 sustituciones conservativas, tales como menos de 12, menos de 10, o menos de 8 o menos de 5 sustituciones conservativas.

Las secuencias nucleotídicas para uso como se describe aquí pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos distintos de modificaciones de oligonucleótidos. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato, y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, debe entenderse que las secuencias nucleotídicas descritas aquí pueden modificarse con cualquier método disponible en la técnica. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias nucleotídicas como se describen aquí.

Se describe aquí el uso de secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias presentadas aquí, o a cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento

de la misma, entonces esa secuencia se puede utilizar como sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100 % homólogos a las secuencias como se describen aquí, pero que se encuentran dentro del alcance de la presente invención, pueden obtenerse de distintas maneras. Otras variantes de las secuencias como se describen aquí pueden obtenerse, por ejemplo, sondando genotecas de ADN que se obtienen a partir de una variedad de individuos, por ejemplo individuos de distintas poblaciones. Adicionalmente, es posible obtener otros homólogos, y en general tales homólogos y fragmentos de estos tendrán la capacidad de hibridarse selectivamente con las secuencias que se muestran en la lista de secuencias aquí. Tales secuencias pueden obtenerse sondando las genotecas de ADNc elaboradas o genotecas de ADN de otras especies animales, y sondando tales genotecas con sondas que comprenden toda o parte de cualquiera de las secuencias en las listas de secuencias adjuntas en condiciones de rigurosidad media a alta. Consideraciones similares se aplican para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias polipeptídicas o nucleotídicas como se describen aquí.

También es posible obtener variantes y homólogos de cepa/especie con el uso de PCR con cebadores degenerados diseñados para dirigir las secuencias dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias como se describen aquí. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, al alinear las secuencias de aminoácidos de múltiples variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia pueden realizarse con el uso de programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se usa ampliamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas, y se usarán en condiciones de rigurosidad menor en comparación con las condiciones utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencias individuales contra secuencias conocidas.

Alternativamente, tales polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios silenciosos de secuencias de codones para optimizar las preferencias codónicas para una célula hospedadora particular en la que se expresan las secuencias polinucleotídicas. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) como se describen aquí se pueden utilizar para producir un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo marcada con un marcador revelador por medios convencionales usando marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tienen al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud, y también están englobados en el término polinucleótidos de la presente invención como se usa aquí.

Los polinucleótidos, tales como los polinucleótidos y sondas de ADN como se describen aquí, pueden producirse de manera recombinante, sintética, o por cualquier método disponible para los expertos en la técnica. Además, pueden clonarse mediante técnicas convencionales.

Generalmente, los cebadores se producen por medios sintéticos, que implican una elaboración gradual de la secuencia de ácido nucleico deseada, un nucleótido por vez. Las técnicas para lograr esto mediante el uso de técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Generalmente, los polinucleótidos más largos se producirán con el uso de medios recombinantes, por ejemplo con el uso de técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de restricción de reconocimiento de enzimas adecuados, de manera que el ADN amplificado se pueda clonar en un vector de clonación adecuado.

## **NUMERACIÓN DE AMINOÁCIDOS**

En la presente invención, puede emplearse una numeración específica de posiciones de restos de aminoácidos en las xilanasas utilizadas en la presente invención. Mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las xilanasas de la muestra con la xilanasa de la presente invención (particularmente SEQ ID No. 1), es posible asignar un número a una posición de restos de aminoácido en la xilanasa de la muestra que corresponde a la posición de restos de aminoácido o la numeración de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 de la presente invención.

## HIBRIDACIÓN

Se describen aquí secuencias que son complementarias a las secuencias de ácido nucleico como se describen aquí, o secuencias que tienen la capacidad de hibridarse ya sea con las secuencias como se describen aquí o con secuencias complementarias a estas.

5 El término "hibridación", como se usa aquí, incluirá "el proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria por medio de emparejamiento de bases", así como el proceso de amplificación como se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10 Se describen aquí el uso de secuencias nucleotídicas que tienen la capacidad de hibridarse con las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas aquí o cualquier fragmento o derivado de las mismas.

El término "variante" abarca también secuencias que son complementarias a secuencias que tienen la capacidad de hibridarse a las secuencias nucleotídicas presentadas aquí.

15 Preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50 °C y 0,2xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato de Na<sub>3</sub> 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias nucleotídicas presentadas aquí.

20 Más preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones muy rigurosas (por ejemplo, 65 °C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato de Na<sub>3</sub> 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias nucleotídicas presentadas aquí.

25 Se describen aquí secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas como se describen aquí (que incluyen secuencias complementarias a las presentadas aquí).

Se describen aquí secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas como se describen aquí (que incluyen secuencias complementarias a las presentadas aquí).

30 Preferiblemente, la hibridación se analiza sobre la totalidad de las secuencias que se ilustran aquí.

## EXPRESIÓN DE ENZIMAS

35 La secuencia nucleotídica como se describe aquí se puede incorporar a un vector replicable recombinante. El vector se puede utilizar para replicar y expresar la secuencia nucleotídica, en forma de proteína/enzima, en y/o a partir de una célula hospedadora compatible.

La expresión se puede controlar con el uso de secuencias de control, por ejemplo secuencias reguladoras.

40 La proteína producida por una célula recombinante hospedadora por la expresión de la secuencia nucleotídica se puede segregar o puede estar contenida intracelularmente, según la secuencia y/o vector que se use. Las secuencias codificantes se pueden diseñar con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificantes de la sustancia a través de una membrana de célula procariota o eucariota determinada.

## 45 VECTOR DE EXPRESIÓN

La expresión "vector de expresión" se refiere a un constructo con la capacidad de expresión *in vivo* o *in vitro*.

50 Preferiblemente, el vector de expresión se incorpora al genoma de un organismo hospedante adecuado. El término "incorporado" incluye preferiblemente la incorporación estable en el genoma.

La secuencia nucleotídica como se describe aquí puede estar presente en un vector en el cual la secuencia nucleotídica se une operativamente a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica por medio de un organismo hospedante adecuado.

55 Los vectores como se describen aquí se pueden transformar en una célula hospedadora adecuada como se describe más adelante, para proporcionar la expresión de un polipéptido como se describe aquí.

60 La elección del vector, por ejemplo un plásmido, cósmido o un vector del fago, dependerá a menudo de la célula hospedadora en la cual se va a introducir.

Los vectores como se describen aquí pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tal como un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección se puede realizar por cotransformación (como se describe en el documento WO 91/17243).

Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN, o para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.

5 Se describe aquí un método para obtener secuencias nucleotídicas como se describen aquí introduciendo una secuencia nucleotídica como se describe aquí en un vector replicable, la introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible, y haciendo crecer la célula hospedadora en condiciones que dan lugar a la replicación del vector.

10 El vector puede comprender además una secuencia nucleotídica que permite al vector replicarse en la célula hospedadora en cuestión. Los ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

### SECUENCIAS REGULADORAS

15 En algunas aplicaciones, la secuencia nucleotídica como se describe aquí se une operativamente a una secuencia reguladora capaz de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica, tal como por medio de la célula hospedadora escogida. Se describe aquí un vector que comprende la secuencia nucleotídica como se describe aquí unida operativamente a esa secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

20 La expresión "unida operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su forma prevista. Una secuencia reguladora "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias control.

25 La expresión "secuencias reguladoras" incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

El término "promotor" se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo un sitio de unión de la ARN-polimerasa.

30 La expresión mejorada de la secuencia nucleotídica como se describe aquí que codifica la enzima de la presente invención puede lograrse también por la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo regiones promotoras, líder de secreción y terminadoras.

35 Preferiblemente, la secuencia nucleotídica como se describe aquí se une operativamente a al menos un promotor.

Incluso se pueden utilizar otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido como se describe aquí.

40 Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica en un hospedante bacteriano, fúngico o de levadura son muy conocidos en la técnica.

El promotor puede incluir además características para asegurar o aumentar la expresión en un hospedante adecuado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas, tales como una caja de Pribnow o una caja TATA.

### 45 CONSTRUCTOS

El término "constructo", que es sinónimo de términos tales como "producto conjugado", "casete" e "híbrido", incluye una secuencia nucleotídica como se describe aquí unida directa o indirectamente a un promotor.

50 Un ejemplo de unión indirecta es la provisión de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia intrónica, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, entre el promotor y la secuencia nucleotídica como se describe aquí. Lo mismo es válido para el término "fusionada" con respecto a la presente invención, que incluye una unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no incluyen la combinación natural de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína asociada normalmente con el promotor del gen de tipo salvaje y cuando ambos se encuentran en su ambiente natural.

El constructo puede incluso contener o expresar un marcador que permite la selección del constructo genético.

60 Para algunas aplicaciones, el constructo como se describe aquí comprende preferiblemente al menos la secuencia nucleotídica como se describe aquí unida operativamente a un promotor.



**CÉLULAS HOSPEDADORAS**

La expresión "célula hospedadora" como se describe aquí incluye cualquier célula que comprende la secuencia nucleotídica o un vector de expresión como se describió anteriormente, y que se utiliza en la producción recombinante de una proteína que tiene las propiedades específicas como se definen aquí.

5 En una realización, el organismo es un hospedante de expresión.

Se describen aquí células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que expresa la proteína como se describe aquí. Las células se escogerán para ser compatibles con dicho vector, y pueden ser por ejemplo células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas o de levadura.

10 Ejemplos de organismos hospedantes bacterianos adecuados son especies bacterianas grampositivas o gramnegativas.

15 Como se describe aquí, las xilanasas que se ilustran aquí se expresan en el hospedante de expresión *Trichoderma reesei*.

20 Como se describe aquí, el hospedante de expresión para las xilanasas que se ilustran aquí puede ser uno o más de los siguientes hospedantes de expresión fúngica: *Fusarium* spp. (tal como *Fusarium oxysporum*); *Aspergillus* spp. (tal como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, o *A. awamori*) o *Trichoderma* spp. (tal como *T. reesei*).

25 Como se describe aquí, el hospedante de expresión puede ser uno o más de los siguientes hospedantes de expresión bacteriana: *Streptomyces* spp. o *Bacillus* spp. (por ejemplo *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*).

El uso de células hospedadoras adecuadas, tales como células hospedadoras de levadura y fúngicas, puede proporcionar las modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, miristoilación, glicosilación, truncamiento, lipidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) según sea necesario para conferir una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinante como se describen aquí.

**ORGANISMO**

30 El término "organismo", en relación con la presente invención, incluye cualquier organismo que podría comprender la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido como se describe aquí y/o productos obtenidos a partir de allí, y/o en la que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica como se describe aquí cuando está presente en el organismo.

35 En una realización, el organismo es un hospedante de expresión.

Los organismos adecuados pueden incluir un procariota, hongo, levadura o una planta.

40 La expresión "organismo transgénico", en relación con la presente invención, incluye cualquier organismo que comprende la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido como se describe aquí y/o los productos obtenidos de allí, y/o en la que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica como se describe aquí dentro del organismo. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica se incorpora al genoma del organismo.

45 La expresión "organismo transgénico" no abarca las secuencias codificantes nucleotídicas nativas en su ambiente natural cuando se encuentran bajo el control de su promotor nativo que también está en su entorno natural.

50 Por lo tanto, el organismo transgénico como se describe aquí incluye un organismo que comprende una cualquiera de, o combinaciones de, la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido como se describe aquí, constructos como se describen aquí, vectores como se describen aquí, plásmidos como se describe aquí, células como se describen aquí, tejidos como se describen aquí, o los productos de los mismos.

55 Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido como se describe aquí bajo el control de un promotor heterólogo.

**TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS/ORGANISMOS HOSPEDADORES**

60 Como se indicó anteriormente, el organismo hospedante puede ser un organismo procariota o un organismo eucariota. Los ejemplos de hospedantes procariotas adecuados incluyen *E. coli*, *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp., por ejemplo, *Bacillus subtilis*.

65 Las enseñanzas sobre la transformación de hospedantes procariotas están bien documentadas en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.<sup>a</sup> edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Cuando se utiliza un hospedante procariota, puede ser necesario modificar adecuadamente la secuencia nucleotídica antes de la transformación, tal como mediante la eliminación de intrones.

Las células de hongos filamentosos pueden transformarse mediante el uso de diversos métodos conocidos en la técnica, tales como un procedimiento que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguido de la regeneración de la pared celular de una manera conocida. El uso de *Aspergillus* como microorganismo hospedante se describe en el documento EP 0238023.

La transformación de procariotas, hongos y levaduras es muy conocida generalmente para un experto en la técnica.

Un organismo hospedante puede ser un hongo, tal como un moho. Los ejemplos de tales hospedantes adecuados incluyen cualquier miembro que pertenezca a los géneros *Trichoderma* (por ejemplo, *T. reesei*), *Thermomyces*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, y similares.

Como se describe aquí, el organismo hospedante puede ser un hongo. Como se describe aquí, el organismo hospedante pertenece al género *Trichoderma*, por ejemplo *T. reesei*.

## CULTIVO Y PRODUCCIÓN

Las células hospedadoras transformadas con la secuencia nucleotídica como se describe aquí se pueden cultivar en condiciones que llevan a la producción del polipéptido codificado y que facilitan la recuperación del polipéptido de las células y/o el medio de cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer que la célula hospedadora en cuestión crezca y para obtener la expresión del polipéptido.

La proteína producida por una célula recombinante puede exhibirse en la superficie de la célula.

La proteína puede segregarse de las células hospedadoras y recuperarse adecuadamente del medio de cultivo con el uso de procedimientos muy conocidos.

## SECRECIÓN

Frecuentemente, se desea que la proteína se segregue del hospedante de expresión al medio de cultivo desde donde la proteína puede recuperarse con más facilidad. Según la presente invención, la secuencia líder de secreción puede seleccionarse en función de un hospedante de expresión deseado. Las secuencias señal híbridas también se pueden utilizar en el contexto de la presente invención.

## APLICACIÓN A GRAN ESCALA

En una realización preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se utiliza para aplicaciones a gran escala.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 1 g por litro a alrededor de 100 g por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedante.

De manera conveniente, la secuencia de aminoácidos puede producirse en una cantidad de 30 g por litro a alrededor de 90 g por litro de volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedante.

## TÉCNICAS GENERALES DE LA METODOLOGÍA DE ADN RECOMBINANTE

La presente invención emplea, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Volúmenes 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y, D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

La invención se describirá ahora, a modo de ejemplo únicamente, con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### Materiales y métodos

## Plásmido y construcción de la genoteca

Una secuencia de ADN que contiene la región codificante para la xilanasa 4 (la familia GH10) del hongo filamentoso *Fusarium verticilloides*, FveXyn4, se amplificó a partir del ADN genómico con los cebadores específicos del gen extendido con los sitios attB1 y attB2 para permitir la clonación por recombinación Gateway® BP en el vector pDonor221 (Invitrogen, EE. UU.). El plásmido pEntry-FveXyn4, como se muestra en la Figura 20, se usó por los proveedores BaseClear (Países Bajos) y Geneart GmbH (Alemania) como molde para la construcción de genotecas combinatorias.

Las variantes de FveXyn4 se generaron ya sea como genotecas combinatorias o por introducción de mutaciones específicas, y se diseñaron para incluir cantidades y combinaciones diferentes de las mutaciones presentadas en la Tabla 1. Las variantes A, B, C, D y E y las variantes del Ejemplo 12 se incluyeron en estas variantes.

Las variantes combinatorias se generaron por medio de una técnica de recombinación Gateway® (Invitrogen, EE. UU.) con el vector de destino pTTTpyr2 (Figura 21). Los plásmidos de expresión resultantes pTTTpyr2-FveXyn4\_VAR que expresan Xyn4 con diferentes mutaciones se amplificaron en la cepa DH5a de *Escherichia coli*, se purificaron, se secuenciaron, y se dispusieron individualmente en 96 MTP, y se usaron para la transformación fúngica como se describe más adelante. El vector de expresión contiene las regiones del terminador y del promotor cbhl de *T. reesei*, que permiten una expresión inducible fuerte de un gen de interés, los marcadores selectivos amdS de *Aspergillus nidulans* y pyr2 de *T. reesei*, que confieren crecimiento de transformantes en un medio mínimo con acetamida en ausencia de uridina. Los plásmidos se mantienen autónomamente en la célula fúngica debido a las regiones teloméricas derivadas de *T. reesei*. El uso de plásmidos replicativos produce frecuencias incrementadas de transformación, y elude los problemas de la expresión dependiente del locus observados con la transformación integrativa fúngica.

Las mutaciones específicas se introdujeron en la secuencia genómica de la xilanasa Xyn4 de *Fusarium verticilloides* por medio de síntesis génica *de novo* (GeneArt GmbH, Alemania). Después, las variantes sintéticas se clonaron por el proveedor en el vector de destino pTTT-pyr2 por medio de una técnica de recombinación Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.).

## Cepas fúngicas, medios de crecimiento y transformación

Los plásmidos de expresión (5-10 µl) se transformaron mediante el uso del método de tratamiento de protoplastos con PEG en una cepa de *T. reesei* en la que se suprimieron las células principales y xilanasa 2 ( $\Delta cbh1 \Delta cbh2 \Delta eg1 \Delta eg12 \Delta eg13 \Delta eg14 \Delta eg15 \Delta eg16 \Delta bgl1 \Delta man1 \Delta xyn2$  Prdiv: iRNAxyn1 xyn3: amdS pyr2-). La reducción adicional del fondo de xilanasa 1 y 3 endógeno se logró además al introducir en el genoma de la cepa anfitriona un casete de interferencia ARNi dirigido a apagar la expresión dexyn1 y xyn3 simultáneamente. Todas las transformaciones de alto rendimiento se llevaron a cabo robóticamente en un formato de MTP de 24 pocillos mediante el uso de robots Biomek (Beckman Coulter, EE. UU.). Los plásmidos con variantes se recibieron de los proveedores en las MTP de 96 pocillos dispuestas de acuerdo con un diseño predeterminado. Las mezclas de transformación que contenían aproximadamente 1 µg de ADN y  $5 \times 10^6$  protoplastos en un volumen total de 50 µl se trataron con 200 µl de solución de PEG al 25 %, se diluyeron con 1 volumen de disolución de sorbitol 1,2 M/Tris 10 mM, pH de 7,51 CaCl<sub>2</sub> 10 mM, se volvieron a disponer robóticamente en las MTP de 24 pocillos, y se mezclaron con 1 ml de medio mínimo de agarosa al 3 % que contenía sorbitol 1M y NH<sub>4</sub>Cl 10 mM. Después del crecimiento de los transformantes, las esporas de cada pocillo se agruparon y volvieron a colocar en MTP de 24 pocillos de nueva aportación con MM que contenía acetamida para una presión selectiva adicional. Una vez esporuladas, las esporas se recolectaron y utilizaron para la inoculación de cultivos líquidos ya sea en un formato MTP de 24 pocillos o en matraces de agitación en el siguiente medio de producción: 37 g/l glucosa, 1 g/l soforosa, 9 g/l aminoácidos, 10 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 1 g/l MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 33 g/l ácido 1,4-piperazinbis(propanosulfónico), pH 5,5, 2,5 ml/l de 400X *T. reesei*, oligoelementos (175 g/l ácido cítrico, 200 g/l FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 16 g/l ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 3,2 g/l CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, 1,4 g/l MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 0,8 g/l ácido bórico). Se añadió 1 ml de medio para producir variantes en las MTP de 24 pocillos. Para los matraces de agitación, se aumentaron proporcionalmente los volúmenes.

Las placas se cultivaron durante 6 días a 28 °C y 80 % de humedad con agitación a 200 rpm. Los sobrenadantes del cultivo se recolectaron por filtración a vacío y se utilizaron para analizar su rendimiento y el nivel de expresión.

Para la producción a mayor escala, la fermentación se realizó en un reactor autoclave de 6 litros con agitación continua. Los matraces de agitación se inocularon con las esporas, y se incubaron con agitación durante 3 días a 28 °C en el siguiente medio de matraz de agitación: 5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 14,4 g/l ácido cítrico ×1H<sub>2</sub>O, 1 g/l CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O, 27,5 g/l glucosa, 1 gota de agente antiespumante (EROL DF 6000K). El pH se ajustó con NaOH (2M) a 5,5, y el medio se colocó en el autoclave 20 minutos a 122 °C. Después de enfriar, se añadieron 2,5 ml/l de disolución de oligoelementos para *T. reesei* 400X, (175 g/l de ácido cítrico, 200 g/l FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 16 g/l ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O, 3,2 g/l CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O, 1,4 g/l MnSO<sub>4</sub>×H<sub>2</sub>O, 0,8 g/l ácido bórico). Las células del matraz de agitación se utilizaron para inocular el biorreactor que contenía el siguiente medio de biorreactor: 4,7

g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 4,3 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 45 g/l glucosa, 0,7 g/l  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g/l agente antiespumante (EROL DF 6000K), 2,5 ml/L de oligoelementos para *T. reesei* 400X (175 g/l ácido cítrico, 200 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 16 g/l  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,2 g/l  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 g/l  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0,8 g/l ácido bórico). La temperatura se controló a 34 °C; el pH se controló continuamente mediante adición de hidróxido de amonio al 20 %. El oxígeno disuelto se controló a un mínimo de saturación de 40 % variando velocidad de agitación. Se midió el dióxido de carbono liberado y el contenido de oxígeno. Cuando se agotó la glucosa inicial, se inició una alimentación constante de glucosa/soforosa. Al mismo tiempo, la temperatura se redujo hasta y se controló a 28 °C; el pH se aumentó hasta y se controló a 4,5. La fermentación finalizó después de 140 horas. Se extrajo el caldo del tanque, y las células se separaron por filtración. Después de separar las células, el producto filtrado se concentró por ultrafiltración. Finalmente, el producto concentrado se filtró por esterilización y se utilizó para estudios de estabilidad del producto peletizado.

## MUESTRAS DE ENZIMAS

La actividad xilanasa de los sobrenadantes del cultivo de la MTP se determinaron mediante el uso del método para medir la actividad xilanasa como se describe a continuación. Los sobrenadantes del cultivo se diluyeron 20 y 130 veces en acetato de sodio 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0. Se mezclaron 25 µl de una muestra de enzima diluida con 150 µl de sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5,0, y se incubó a 30 °C durante 15 min con agitación. Después de la incubación, se mezclaron 45,4 µl de la muestra de reacción con 135 µl de disolución de trabajo de PAHBAH, y se incubaron a 95 °C durante 5 min antes de enfriarse hasta 20 °C durante 10 s. Una muestra de 100 µl se transfirió a un pocillo de una placa de microtitulación, y la lectura de la placa se realizó a 410 nm.

La actividad se calculó como el promedio de tres réplicas tras restar un blanco que incluía acetato de sodio 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0, en lugar de la enzima. La concentración de proteína de las muestras se calculó en función de una curva patrón de FveXyn4 purificada (SEQ ID No. 1). Todas las muestras se diluyeron hasta 50 ppm en acetato de sodio 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0. Estas muestras normalizadas se utilizaron como disolución de partida enzimática en los ensayos que se describen más adelante.

La concentración proteínica de la disolución de partida enzimática se determinó por HPLC como se describe más adelante.

La actividad xilanasa de productos concentrados esterilizados por filtración de la producción a gran escala se midió con el siguiente ensayo de actividad. Se pesaron 0,5 g de cada producto concentrado en matraces volumétricos de 100 ml, seguido del llenado hasta el volumen con amortiguador de McIlvaine, pH 5,0. Las muestras se diluyeron hasta aprox. 6 UX/ml usando amortiguador McIlvaine, pH 5,0. Se añadieron 100 µl de muestra diluida a 1 ml de amortiguador de McIlvaine, pH 5,0, en tubos de ensayo, y se equilibró a 40 °C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (100 mg) para iniciar la reacción, y las muestras se incubaron a 40 °C durante 10 min antes de detener la reacción añadiendo 10 ml de Tris al 2 %, pH 12,0. La disolución se mezcló con un mezclador de vórtice, se dejó reposar durante 5 min, y se mezcló nuevamente antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado. La actividad xilanasa se cuantificó con respecto a un patrón enzimático (Danisco Xylanase, disponible en Danisco Animal Nutrition).

La enzima utilizada como patrón comparativo, Econase® XT, está disponible comercialmente, y se extrajo de muestras comerciales formuladas en seco. El componente xilanasa de las muestras comerciales formuladas en seco de Econase® XT se extrajo en una suspensión al 33 % (p/p) mediante el uso del amortiguador de McIlvain, pH 5,0. El extracto se aclaró usando centrifugación (3000 RCF durante 10 min), y se filtró usando un filtro de jeringa PALL Acrodisc PF (membrana Super de 0.810.2 µm), y posteriormente se calentó a 70 °C durante 20 min. Después de separar el precipitado por centrifugación (38 724 RCF durante 15 min), el amortiguador se reemplazó mediante pasada a través de una columna de Sephadex G25 (PD10 de Pharmacia) equilibrada con citrato de Na 20 mM, NaCl 20 mM, pH 3,4. La purificación del componente xilanasa se llevó a cabo usando la resina Source 15S, seguido de elución con un gradiente salino de incremento lineal (NaCl en amortiguador de citrato de Na 20 mM, pH 3,4).

Econase XT® es una endo-1,4-β-xilanasa (EC 3.2.1.8) producida por la cepa *Trichoderma reesei* RF5427 (CBS 114044), disponible de ABVista.

La concentración de proteína se determinó midiendo la absorción a 280 nm. Los coeficientes de extinción fueron estimados a partir de las secuencias de aminoácidos. Para Econase XT, se calculó que la absorción a 280 nm de 1 mg/ml fue 2,84 UA.

## Determinación de proteínas por HPLC

Se utilizó una MTP (Agilent pieza núm. 5042-1385) que contenía 100 µl de disolución de partida enzimática con una concentración aproximada de 50 ppm por pocillo para el método de determinación de proteínas por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). Se utilizó HPLC Agilent 1260 o 1290 (Hewlett Packard) equipado con una columna Acuity UPLC BEH 125 SEC (Waters) para separar los contaminantes restantes. La

muestra se eluyó de la columna usando amortiguador de fosfato sódico 25 mM, pH 6,8, que contenía cloruro sódico 250 mM. La absorbancia se midió a 220 nm, se integró con el uso del programa Chemstation (Agilent Technologies), y la concentración de proteínas de las muestras se determinó en base a una curva patrón de proteína/enzima FveXyn4 purifica que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1.

#### Medida de la actividad xilanasa

La actividad xilanasa de muestras enzimáticas se determinó midiendo la cantidad de azúcares reductores liberados de WE-AX de trigo hidrolizado (arabinoxilano extraíble en agua). La cantidad de azúcares reductores se midió mediante el método PAHBAH. En resumen, por medio de condiciones de calor y alcalinas, los grupos terminales reductores reaccionan con la PAHBAH incolora (hidrazida de ácido 4-para-hidroxibenzoico), por lo cual la PAHBAH se oxida, y la absorbancia se mide a 410 nm (Lever, 1972).

Se preparó sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5,0, mediante la humectación de 0,25 g de arabinoxilano de trigo soluble (por ejemplo, Megazyme, viscosidad alta ~43 cSt, P-WAXYH) con 2,5 ml de etanol del 96% antes de añadir 50 ml de acetato sódico 0,1 M, pH de 5,0. La determinación de la actividad patrón se llevó a cabo a un pH de 5,0. Para la medida a otros valores de pH, los 50 ml de acetato sódico 0,1 M, pH 5,0, se sustituyeron por el amortiguador indicado. La disolución se calentó con agitación hasta la ebullición, y se enfrió con agitación hasta temperatura ambiente.

Se preparó la disolución de trabajo de PAHBAH mezclando disolución de partida de PAHBAH al 5 % (4-hidroxibenzidrazida, por ejemplo Sigma-Aldrich H9882) en HCl 0,5 M con NaOH 0,5 M a una razón de 1:4 (v/v). La disolución se preparó el día del análisis y se protegió de la luz.

Las muestras enzimáticas se diluyeron en el amortiguador indicado a una concentración de 1 µg/ml antes del análisis. Se mezclaron 25 µl de una muestra de enzima diluida con 150 µl de sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5,0, y se incubó a 30 °C durante 15 min con agitación. Después de la incubación, se mezclaron 45,4 µl de la muestra de reacción con 135 µl de disolución de trabajo de PAHBAH, y se incubaron a 95 °C durante 5 min antes de enfriarse hasta 20 °C durante 10 s. Una muestra de 100 µl se transfirió a un pocillo de una placa de microtitulación, y la lectura de la placa se realizó a 410 nm.

La actividad se calculó como la media de tres réplicas tras restar un blanco que incluía el amortiguador de dilución adecuado en lugar de enzima.

#### Ensayo para la medida de la termoestabilidad

Los perfiles de desnaturalización térmica de las variantes de FveXyn4 se determinaron mediante la dilución y preincubación de las muestras enzimáticas en amortiguador MES 25 mM, (Tween 80 al 0,00125 % - amortiguador MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 al 0,00125 % (V:V)), pH 6,0 durante 10 min a temperaturas variables (66, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6 y 85 °C, respectivamente), y midiendo después la actividad residual con el método de la actividad xilanasa descrito anteriormente. La actividad medida sin preincubación se fijó en 100 %, y la actividad residual de cada variante a cada una de las temperaturas se calculó con respecto a esta. El valor de Tm se calcula a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la que se obtiene 50 % de la actividad residual.

#### Perfil de pH

El perfil de pH de las variantes de FveXyn4 se analizó midiendo la actividad a pH 4,0, 5,0 y 6,0. La actividad se midió esencialmente como se describe en el método de la actividad xilanasa descrito anteriormente. Las muestras enzimáticas se diluyeron en acetato de sodio 0,1 M, pH 4,0, acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0, BSA al 0,1% (por ejemplo, Sigma A7906) o amortiguador de Mclvaine, pH 6,0, para determinar la actividad a pH 4,0, 5,0 o 6,0, respectivamente, antes del análisis. Se preparó sustrato WE-AX al 0,5 % a pH 4,0 y 6,0 como se describió para el sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5,0, pero el acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0, se sustituyó por acetato sódico 0,1 M, pH 4,0, o amortiguador de Mclvaine, pH 6,0, respectivamente. Todos los datos se calculan con respecto a FveXyn4 a pH 5,0.

#### Solubilización de pentosano (solubilización de AXinsol)

El sustrato utilizado para medir la solubilización de pentosano por variantes de FveXyn4 fue DDGS de maíz y salvado de trigo. Se transfirieron 100 mg de cDDGS o salvado de trigo con un tamaño de partícula < 212 µm a un tubo Eppendorf de 2 ml, y se registró el peso exacto. Se añadieron 750 µl de amortiguador de incubación (HEPES 200 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 6,0) y 900 µl de cloranfenicol (40 µg/ml en amortiguador de incubación). Se añadieron dosificaciones de enzimas cada vez mayores para conformar un volumen total de 1,8 ml.

Cada muestra se ensayó por duplicado en paralelo con una muestra de control (sin enzima). Las muestras se incubaron a 40 °C con agitación. Después de 18 horas de incubación, el sobrenadante se filtró usando placas de

filtro de 96 pocillos (Pall Corporation, AcroPrep 96 Filter Plate, vidrio 1,0 µm, NTRL, pocillo de 1 ml). Después de la filtración, las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el análisis de la cantidad total de azúcares de C5, arabinosa y xilosa.

## 5 Cuantificación de azúcares de C5 (pentosanos)

La cantidad total de pentosas incorporadas a la disolución se determinó usando el método de Rouau y Surget (1994) con un aparato de inyección de flujo continuo. Los sobrenadantes se trataron con ácido para hidrolizar los polisacáridos a monoazúcares. Se añadió floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) para la reacción con monopentosas y monohexosas, que forma un complejo coloreado.

Al medir la diferencia en la absorbancia a 550 nm en comparación con 510 nm, la cantidad de pentosas en la disolución se calculó con el uso de una curva patrón. A diferencia del complejo de pentosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo de hexosa-floroglucinol es constante a estas longitudes de onda. Se añadió glucosa a la disolución de floroglucinol para crear una señal de glucosa constante y asegurar además que no hubiera interferencia de los azúcares hexosas. La concentración de pentosa en las muestras se determinó usando una curva patrón de xilosa.

## Reducción de la viscosidad en el ensayo del modelo animal *in vitro*

La reducción de la viscosidad en trigo se determinó usando una versión modificada del procedimiento descrito por Bedford y Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). Se mezclaron 3,6 ml de disolución de pepsina (2000 U/ml en HCl 0,1 N) con 2,4 g de trigo antes de la adición de la cantidad indicada de xilanasa (variantes de FveXyn4), seguido de 45 min de incubación a 40 °C. Después, se mezclaron 1,2 ml de disolución de pancreatina (8 mg/ml en MES 1 M, pH 6,8) en la suspensión para producir un pH final de 6,0. La muestra se dejó incubando durante 60 min a 40 °C, mezclando después de 30 y 60 min. Después, la muestra se colocó sobre hielo durante 5 min para detener la reacción, y se centrifugó 10 min a 3320 RCF, seguido de filtración a través de un filtro de 0,45 µm para obtener un sobrenadante transparente. Después, se determinó la viscosidad de la muestra a 20 °C con un viscosímetro digital Brookfield (modelo DV-I+, Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA 02172, USA) equipado con un cono CPE-40 y placa. Cada punto de datos es el promedio de tres repeticiones.

## Estabilidad de la peletización

Las pruebas de peletización se realizaron a escala completa en el Technological Institute, Kolding, Dinamarca. Cada concentrado de xilanasa filtrado estéril se formuló en trigo y se mezcló en una mezcla de pienso de maíz/soja (61,1 % de maíz, 31,52 % de Hipro Soya 48, 4,00 % de aceite de soja, 0,40 % de bicarbonato sódico, 0,25 % de vitaminas/minerales Leghennen, 0,20 % de DL-metionina, 1,46 % de fosfato dicálcico, 1,16 % de caliza). Se preparó una premezcla mezclando las variantes de xilanasa formuladas en trigo en 10 kg de mezcla de pienso de maíz/soja, y se mezcló durante 10 min. Después, la premezcla se añadió a 120 kg de pienso y se mezcló durante 10 min antes del acondicionamiento. El pienso se acondicionó durante 30 s a 90 y 95 °C antes de la peletización. El producto macerado y los peletes de pienso resultantes se trituraron con un molino de laboratorio Perten (es importante que el triturado de todas las muestras sea igual), antes de analizar la actividad xilanasa en las muestras de acuerdo con el método de obtención de extracto o suspensión espesa descrito más abajo usando arabinoxilano reticulado con azurina de trigo (por ejemplo, comprimido de Xylazyme, Megazyme, Irlanda) como sustrato.

Método de obtención del extracto: Se mezclaron 5,0 g de muestra triturada con 50 ml de amortiguador de McIlvaine, pH 5,0, y se agitaron en un agitador magnético durante 10 min. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio, y se diluyó 3-6 veces en 50 ml de amortiguador de McIlvaine, pH 5,0. Se mezclaron 100 µl de extracto diluido con 400 µl de amortiguador de McIlvaine, pH 5,0, que se equilibró a 50 °C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (60 mg) para iniciar la reacción, y las muestras se incubaron a 50 °C durante 60 min antes de detener la reacción añadiendo 5 ml de Tris al 2 %, pH 12,0. La disolución se mezcló con un mezclador de vórtice, se dejó reposar durante 5 min, y se mezcló nuevamente antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado.

La actividad xilanasa se cuantificó con una curva patrón de xilanasa preparada usando cada una de las variantes de xilanasa en un blanco de producto macerado (sin enzima) y pienso a 90 °C. La xilanasa formulada de trigo respectiva se extrajo durante 10 min en amortiguador de McIlvaine, pH 5,0, para obtener una concentración de 160 UX/ml. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio, y a continuación se añadieron 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de extracto a 5,0 g de muestras de blanco de producto macerado triturado y pienso a 90 °C. La actividad xilanasa en estas muestras patrón se midió como se describe en el método de obtención de extracto anterior. Cada curva patrón se preparó una vez.

Método de suspensión: Se mezclaron 1,0 g de muestra triturada con 50 ml de amortiguador de McIlvaine, pH 5,0, y se agitó en un agitador magnético en un baño maría a 50 °C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (100 mg) para iniciar la reacción, y las muestras se incubaron con agitación a 50 °C durante 20 min (30 min para

la Variante B). Después de la incubación, las muestras se filtraron a través de un filtro de fibra de vidrio, y la absorbancia del sobrenadante se midió a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado.

La actividad xilanasa se cuantificó con una curva patrón de xilanasa preparada para cada una de las variantes de xilanasa en un blanco de pienso de producto macerado (sin enzima). La xilanasa formulada de trigo respectiva se extrajo durante 10 min en amortiguador de Mcllvaine pH 5,0 para obtener una concentración de 30 UX/ml. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio, y a continuación se añadieron 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 µl a muestras 1,0 g de blanco de pienso de producto macerado triturado. La actividad xilanasa en estas muestras patrón se midió como se describe en el método de obtención de suspensión anterior. La curva patrón se preparó una vez.

La recuperación medida en el pienso de producto macerado se ajustó a 100 %, y la actividad residual del pienso a 90 y 95 °C se calculó con respecto a esto.

## **Resultados y Discusión**

Después de un trabajo significativo, se identificaron cinco variantes de la xilanasa esqueleto FveXyn4.

Las cinco variantes son extremadamente más termoestables que la molécula de referencia/parental, FveXyn4, como se muestra en la Figura 11.

La caracterización adicional de la variante basándose en las propiedades bioquímicas y de rendimiento importantes para una xilanasa que se utilizará por ejemplo en aplicaciones de pienso identificó estas variantes como aquellas que eran termoestables y tenían un rendimiento/actividad bioquímica adecuados.

Tabla 1: Visión general de mutaciones en las cinco variantes de FveXyn4	
Variantes	Mutaciones
<b>A</b>	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_K79Y_S89G_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S19 3Y_A217Q_G219P_T298Y
<b>B</b>	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S19 3Y_A217Q_G219P_T298Y
<b>C</b>	N7D_N25P_T33V_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
<b>D</b>	N7D_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
<b>E</b>	N7D_N25P_T33V_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
La numeración se basa en la secuencia madura de FveXyn4. SEQ ID No. 1.	



La Figura 11 muestra el valor de  $T_m$  de las 5 variantes A, B, C, D y E en comparación con *FveXyn4*. El valor de  $T_m$  se mide como la temperatura a la cual se obtiene 50 % de actividad residual después de 10 min de incubación.

- 5 La Figura 12 muestra el perfil de pH de las cinco variantes medido a pH 4,0, 5,0 y 6,0, y todos los datos están con respecto a la variante de tipo salvaje a pH 5,0. Las cinco variantes tienen un perfil de pH que es ideal para utilizar por ejemplo en aplicaciones para pienso.

- 10 Las Figuras 13a y 13b muestran curvas de respuesta a la dosis en la solubilización del pentosano a partir de DDGS de maíz y salvado de trigo, respectivamente, por las cinco variantes. Las cinco variantes muestran una gran capacidad para solubilizar arabinoxilano (pentosano) a partir de DDGS y salvado de trigo, y todas al mismo nivel que la molécula de tipo salvaje. Las cinco variantes son muy adecuadas para uso por ejemplo en pienso para animales.

- 15 La Figura 14 muestra la reducción de la viscosidad en la "Reducción de la viscosidad en el ensayo de un modelo animal *in vitro*" que se ilustra en el Ejemplo 1. Las cinco variantes muestran una alta capacidad para reducir la viscosidad, y todas en el mismo nivel que la molécula de tipo salvaje, y fueron mucho mejores que la Econase XT de referencia.

- 20 La Figura 15 muestra una recuperación de xilanasa en el pienso después de la granulación a 90 y 95 °C. Las cinco variantes muestran una alta recuperación de xilanasa después de la peletización, y significativamente más alta que la variante de tipo salvaje.

## EJEMPLO 2

25

### Clonación de la xilanasa (*FveXyn4*) esqueleto (parental) de *Fusarium verticillioides*

Se utilizó el ADN genómico aislado de una cepa de *Fusarium verticillioides* para amplificar un gen de xilanasa. La secuencia del gen clonado, denominado gen *FveXyn4*, se muestra en SEQ ID No. 2. La proteína madura codificada por el gen *FveXyn4* se muestra en SEQ ID No. 1. El producto proteínico del gen *FveXyn4* pertenece a la familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10) según la búsqueda en PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

30

## EJEMPLO 3

### Expresión de la proteína esqueleto (parental) de *FveXyn4*

35

El gen *FveXyn4* se amplificó a partir del ADN genómico de *Fusarium verticillioides* mediante el uso de los siguientes cebadores: Cebador 1 5'-caccATGAAGCTGTCTTCTTCTCTA-3' (SEQ ID No. 22), y Cebador 2 5'-TTTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAGC-3' (SEQ ID No. 23). El producto de PCR se clonó en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen K2400) para generar el plásmido *FveXyn4* pEntry. El plásmido de expresión pZZH254 se obtuvo por reacción de clonación Gateway entre el plásmido *FveXyn4* pEntry y el vector de expresión pTrex3gM (descrito en el documento US 2011/0136197 A1) mediante el uso del kit para enzimas Gateway® LR Clonase® II (Invitrogen 11791). Se proporciona un mapa del plásmido pZZH254 en la Figura 16. La secuencia del gen *FveXyn4* se confirmó por secuenciación de ADN (SEQ ID No. 2). El plásmido pZZH254 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* con cuatro delecciones (descrita en el documento WO 05/001036) usando el método biolístico (Te'o VS et al., J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002).

45

Después de la confirmación de la secuencia, los protoplastos de una cepa de *T. reesei* con cuatro delecciones (descrita en el documento WO 05/001036) se transformaron con el plásmido de expresión pZZH254 mediante el uso del método de tratamiento de protoplastos con PEG (Penttilä et al., Gene, 61:155-164, 1987). Para la preparación de los protoplastos, se cultivaron esporas durante alrededor de 10 horas a 24°C en medio mínimo MM para *Trichoderma* (20 g/l glucosa, 15 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 4,5, 5 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,6 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,6 g/l  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 1 ml de disolución 1000X de oligoelementos para *T. reesei* (175 g/l ácido cítrico anhidro, 200 g/l  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 16 g/l  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 3,2 g/l  $\text{CuSO}_4$ , 1,4 g/l  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , y 0,8 g/l ácido bórico). Las esporas en germinación se recolectaron por centrifugación, y se trataron con 30 mg/ml de disolución de Vinoflow FCE (Novozymes, AG Suiza) durante un período de 7 horas hasta toda la noche a 30 °C a 100 rpm para la lisis de las paredes celulares fúngicas. Los protoplastos se lavaron con amortiguador Tris HCl 0,1 M (pH de 7) que contenía sorbitol 0,6 M, y se resuspendieron en amortiguador Tris HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía sorbitol 1,2 M y cloruro de calcio 10 mM. Para la transformación con PEG, se trataron aproximadamente 1 µg de ADN y  $1-5 \times 10^7$  protoplastos en un volumen total de 200 µl con 2 ml de disolución de PEG al 25 %, diluida con 2 volúmenes de disolución de sorbitol 1,2 M/Tris 10 mM, pH 7,5/ $\text{CaCl}_2$  10 mM. Se seleccionaron los transformantes en un medio que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (0,6 g/l de acetamida; 1,68 g/l de cloruro de cesio; 20 g/l de glucosa; 15 g/l de dihidrogenofosfato de potasio; 0,6 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado; 0,6 g/l de cloruro de calcio dihidratado; 5 mg/l de sulfato de hierro (II); 1,4 mg/l de sulfato de zinc; 1 mg/l de cloruro de cobalto (II); 1,6 mg/l de sulfato de manganeso (II); 20 g/l de agar; pH 4,25). Las colonias transformadas (alrededor de 50-100) aparecieron en alrededor de 1 semana. Después del cultivo en placas con acetamida, las esporas se recolectaron y se volvieron

65

a seleccionar en placas con acetamida. Después de 5 días, las esporas se recolectaron mediante el uso de glicerol al 10 %, y se inocularon  $1 \times 10^8$  esporas en un matraz de agitación de 250 ml con 30 ml de medio definido de glucosa/soforosa para la expresión de proteínas. La expresión de proteínas se confirmó por SDS-PAGE. La suspensión de esporas se cultivó posteriormente en un fermentador de 7 l en un medio definido que contenía una alimentación de 60 % de glucosa-soforosa. El medio definido de glucosa/soforosa (por litro) consiste en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g, amortiguador PIPPS 33 g, casaminoácidos 9 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4,5 g,  $\text{CaCl}_2$  (anhidro) 1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 g, pH a 5,5 ajustado con NaOH al 50 % con Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$  para llevarlo a 966,5 ml. Después de la esterilización, se añadió lo siguiente: 26 ml de 60 % de glucosa/soforosa y 2,5 ml de disolución de metales traza para *T. reesei* 400X.

FveXyn4 se purificó a partir de un caldo de fermentación concentrado de un cultivo de fermentador de 7 l usando dos columnas de cromatografía. El caldo de fermentación concentrado amortiguado en amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0, que contenía sulfato de amonio 1 M, se cargó en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (Fenil Sepharose FF, 26/10). La proteína se eluyó de la columna usando un gradiente lineal de amortiguador de equilibrio/lavado a amortiguador de fosfato de sodio 20 mM, pH 6,0. La fracción que contenía la proteína FveXyn4 se cargó en una columna de filtración en gel (HiLoad Superdex 75 pg 26/60), y la fase móvil usada fue fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 0,15 M. La proteína purificada se concentró usando un dispositivo 3K Amicon Ultra-15, y la fracción de proteína concentrada se usó en estudios adicionales.

La secuencia nucleotídica del gen *FveXyn4* se describe como SEQ ID No. 24. La secuencia señal se muestra en negrita (letras mayúsculas), y el intrón predicho se muestra en negrita y minúsculas.

La secuencia de aminoácidos de la proteína FveXyn4 se expone como SEQ ID No. 26. La secuencia señal predicha por el programa SignalP-NN se muestra subrayada. Esta es la preproteína.

La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína FveXyn4 se expone como SEQ ID No. 1. Esta es la forma activa de la enzima. SEQ ID No. 27 muestra la proproteína, es decir, antes de la modificación postraducciona. Dependiendo del hospedante, la modificación postraducciona puede variar, y por lo tanto la presente invención abarca también formas activas maduras de SEQ ID No. 27.

#### EJEMPLO 4

##### Actividad de xilanasa de FveXyn4 (una xilanasa parental)

FveXyn4 pertenece a la familia de glicosil hidrolasa 10 (GH10, número CAZy). La actividad de beta 1-4 xilanasa de FveXyn4 se midió usando como sustratos xilano al 1 % de madera de abedul (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1 % de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM). El ensayo se llevó a cabo en citrato de sodio 50 mM, pH 5,3, amortiguador Tween-80 al 0,005 % a 50 °C durante 10 minutos.

El azúcar reductor liberado se cuantificó por reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico y la medida de la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantificó con respecto a una curva patrón de xilosa. En este ensayo, una unidad (U) de xilanasa se define como la cantidad de enzima requerida para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo.

#### EJEMPLO 5

##### Perfil de temperatura de FveXyn4 (una xilanasa parental)

La temperatura óptima de FveXyn4 purificada (una enzima parental) se determinó por el ensayo de la actividad xilanasa a temperaturas que varían entre 40 °C y 75 °C durante 10 minutos en amortiguador de citrato sódico 50 mM a pH 5,3. La actividad fue referida como actividad relativa, en la que la actividad a la temperatura óptima se fijó en 100 %. El perfil de temperatura de FveXyn4 se muestra en la Figura 17. Se encontró que FveXyn4 tenía una temperatura óptima de 60 °C, y se encontró que retenía más de 70 % de la actividad máxima entre 45 °C y 64 °C.

#### EJEMPLO 6

##### Reducción de la viscosidad en el material a base de grano (por ejemplo, para la producción de biocombustibles)

##### Reducción de la viscosidad del trigo

En la industria europea del alcohol combustible, los granos pequeños como trigo, cebada y centeno son materias primas comunes, en contraposición con los Estados Unidos de América, en el que se utiliza principalmente el maíz. Estos granos pequeños contienen, junto al almidón, niveles altos de polímeros de polisacáridos no amiláceos (NSP), como celulosa, beta-glucano y hemicelulosa.

La relación en la que los diferentes NSP están representados difieren para cada materia prima. La Tabla 1 ilustra las diferentes cantidades de NSP en trigo, cebada y centeno en comparación con otras materias primas.

Tabla 1: Polisacáridos no amiláceos presentes en diferentes materias primas (g kg<sup>-1</sup> de materia seca) <sup>1,2</sup>

	Maíz	Trigo	Centeno	Cebada		Avenas	
				Con cáscara	Sin cáscara	Con cáscara	Sin cáscara
Beta-Glucano	1	8	16	42	42	28	41
Celulosa	22	17-20	15-16	43	10	82	14
NCP soluble y no soluble <sup>3</sup>	75	89-99	116-136	144	114	150	113
NSP total	97	107-119	132-152	186	124	232	116
(Bach Knudsen, 1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. Anim. Feed Sci. Technol., 67 (4): 319-338							
<sup>2</sup> Englyst, H. N., Anderson, V. y Cummings, J. H., 1983. Starch and non-starch polysaccharides in some cereal foods. J. Sci. Food Agric., 34: 1434-1440.							
<sup>3</sup> Polisacáridos no celulósicos: pentosanos, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas							

Los NSP proporcionan viscosidad alta a productos macerados de granos. La viscosidad alta tiene un impacto negativo en la producción de etanol, ya que limitará la concentración de sólidos que se puede utilizar en la formación del producto macerado y reducirá la eficacia de la energía del procedimiento. Además, las hemicelulosas residuales presentes durante el procedimiento pueden contribuir a la contaminación en cambiadores de calor y equipos de destilación. El mayor impacto de una alta viscosidad se observa cuando un producto macerado se enfría hasta la temperatura de fermentación (32 °C). Esto explica la necesidad de reducir la viscosidad en algún momento del procedimiento antes de la etapa de enfriamiento. En función del procedimiento usado, se requieren enzimas que actúen a 60 °C y/u 85 °C.

Las enzimas reductoras de viscosidad pueden añadirse en etapas diferentes del procedimiento de producción de etanol: mezclado y/o sacarificación/fermentación. Preferiblemente, las enzimas se añaden en el mezclado para romper la viscosidad inicial.

Los beneficios de usar enzimas de reducción de la viscosidad en el procedimiento de producción de etanol son múltiples:

- Se puede usar un producto macerado de sustancia más seca en el procedimiento
- Puede obtenerse un jarabe final con un contenido de sólidos más alto
- Mayor transferencia de calor, menor requisito de energía
- Menor ensuciamiento del evaporador, lo que reduce los costes de limpieza
- Mayor producción del etanol final
- Calidad mejorada de los DDGS

### **Métodos**

Se utilizó un analizador Rapid Visco Analyzer (RVA 4500) de Perten Instruments para medir los perfiles de viscosidad de una malta de trigo. Esta malta de trigo se preparó de acuerdo con el siguiente protocolo:

Prepárense 60 gramos de DS al 30 % (34,65 % 'en el estado en el que está') de suspensión de trigo (para pruebas simultáneas en dos RVA) como sigue:

- Pénsense 20,80 gramos de trigo
- En un vaso precipitados de vidrio de 100 ml, pénsense 39,20 gramos de agua corriente y añádanse 137 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N

- Añádase el trigo al agua y agítese durante 5 minutos a velocidad máxima (aprox. 500 rpm) con un agitador de cabeza
- 5
- Transfíranse 25,0 gramos de suspensión a una copa de RVA, añádanse enzimas diluidas 50 veces y póngase en marcha el RVA (compruebe si el pH de partida es alrededor de 5,3)
  - Compruébese el pH al final de la prueba con RVA (5,6-5,7)
- 10
- En cada experimento (25 gramos de suspensión), la xilanasa se dosificó a 25 µg de proteína (por 8,66 g de trigo 'en el estado en el que está'), que corresponde a 2,9 µg de proteína/g de trigo 'en el estado en el que está'. Se dosificó SPEZYME® CL a 0,15 kg/TM de trigo 'en el estado en el que está' (2,2 UAA/g 'en el estado en el que está' o 2,6 UAA/g de DS).
- 15
- Una licuefacción de trigo convencional se imitó en el RVA. El pretratamiento se llevó a cabo durante 20 minutos a 60 °C, seguido de una etapa de licuefacción durante 30 minutos a 85 °C. Después del pretratamiento y la licuefacción, la suspensión se enfrió hasta 32 °C, para determinar la viscosidad en las condiciones de fermentación. El pH de la licuefacción se mantuvo entre 5,3 y 5,7.
- 20
- En este experimento, el rendimiento de FveXyn 4 se comparó con las variantes A, B, C, D y E.

	Viscosidad (mPa*s)						
	Blanco (n=2)	FveXyn4	Variante A	Variante B	Variante C	Variante D	Variante E
Después del pretratamiento (tiempo de proceso 1200 segundos)	533 ± 16	206	220	232	224	235	240
Después de la licuefacción (tiempo de proceso 3120 segundos)	347 ± 16	122	125	135	130	141	145
A la temperatura de fermentación (tiempo de proceso 3660 segundos)	765 ± 20	250	257	282	275	302	298

- Los resultados se muestran anteriormente y en la Figura 22.
- 25
- Estos datos muestran que FveXyn4 y todas las variantes funcionan de manera muy similar, mostrando una reducción de la viscosidad de 55-67 % en comparación con el blanco (sólo SPEZYME® CL).

## EJEMPLO 7

### 30 Separación del gluten de trigo del almidón

La separación de la harina de trigo en fracciones de almidón y gluten se aplica industrialmente a gran escala para obtener almidón A de alta calidad y subproductos de almidón B y gluten vital. La separación mejora por la adición de xilanasas.

#### 35 7.1 Materiales y métodos

El siguiente ensayo simula la separación del almidón de trigo de un procedimiento de pasta a 40 °C. En este ensayo, se añade harina de trigo industrial (Cargill) a agua corriente precalentada (50 °C) para crear una suspensión de 35 % de DS mezclando durante 1 minuto en una mezcladora de cocina (Braun). El pH de la suspensión se mantiene 'en el estado en el que está' a ~6,1. Se transfieren 100 gramos de esta suspensión al viscosímetro Haake VT550, calibrado a 40 °C. Después de 1 minuto de incubación, la disolución enzimática se añade a la suspensión. Mientras tanto, el perfil de viscosidad se monitoriza antes y después de añadir la enzima durante 15 minutos en total. Después de la incubación, se toman muestras por triplicado de la suspensión incubada y una muestra de suspensión a  $t_0$ , para una prueba de centrifugado. Cada muestra de prueba de centrifugado tiene un peso total de 22,5 g, que contiene 15,8-15,9 g de muestra de suspensión añadida a 6,6-6,7 g de tubo de centrifuga desechable (15 ml). Todas las muestras se centrifugan en una centrífuga Hermle Z400 durante 15 minutos a 3500 rpm. Los valores de Brix se determinan a partir del jarabe de las muestras centrifugadas.

## 50 EJEMPLO 8

**Clonación de una xilanasa *FoxXyn2* esqueleto (parental) de *Fusarium oxysporum***

La secuencia nucleotídica del gen *FoxXyn2* aislado de *Fusarium oxysporum* se expone como SEQ ID No. 30 (Figura 4A). La secuencia señal se muestra en negrita, y el intrón previsto se muestra en cursiva y minúsculas.

La secuencia de aminoácidos de la proteína FoxXyn2 se expone como SEQ ID No. 29 (Figura 3A). La secuencia señal se muestra en cursiva.

La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína FoxXyn2 se expone como SEQ ID No. 31 o SEQ ID No. 4 (Figuras 3B y 3C).

El producto proteínico del gen *FoxXyn2* pertenece a la familia 10 de glicosil hidrolasas. Esto sugiere que FoxXyn2 es una glicosil hidrolasa segregada.

**EJEMPLO 9****Expresión de la proteína *FoxXyn2* esqueleto (parental)**

El gen *FoxXyn2* se amplificó a partir de ADN genómico de *Fusarium oxysporum* usando los siguientes cebadores: Cebador 1 5'- ccgcgcgcgcaccATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACC-3' (SEQ ID NO:24), y Cebador 2 5'- ccgcgcgcgccttaTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAG -3' (SEQ ID NO:25). Una vez digerido con *Not I* y *Asc I*, el producto de PCR se clonó en el vector de expresión pTrex3gM (descrito en el documento US 2011/0136197 A1) digerido con las mismas enzimas de restricción, y el plásmido resultante se marcó como pZZH135. Un mapa plasmídico de pZZH135 se proporciona en la Figura 18. La secuencia del gen *FoxXyn2* se confirmó por secuenciación de ADN.

El plásmido pZZH135 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* con cuatro delecciones (descrita en el documento WO 05/001036) usando el método biolístico (Te'o V Set al., J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002). La proteína, aislada del sobrenadante de cultivo después de la filtración, se utilizó para realizar un análisis de SDS-PAGE y el ensayo de actividad de xilanasa para confirmar la expresión de la enzima.

La secuencia nucleotídica del gen *FoxXyn2* del plásmido de expresión pZZH135 se expone como SEQ ID No. 4. La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína FoxXyn2 se expone como SEQ ID No. 3.

La proteína FoxXyn2 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo usando una resina para cromatografía de afinidad Blue Sepharose, 6FF, y las muestras se utilizaron para la caracterización bioquímica, como se describe en los ejemplos que siguen.

**EJEMPLO 10****Actividad de xilanasa de *FoxXyn2* esqueleto (parental)**

FoxXyn2 pertenece a la familia 10 de glicosil hidrolasas (GH10, número CAZy). La actividad de beta 1-4 xilanasa de FoxXyn2 se midió usando como sustratos xilano al 1 % de madera de abedul (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1 % de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM). El ensayo se llevó a cabo en citrato de sodio 50 mM, pH 5,3, amortiguador Tween-80 al 0,005 % a 50 °C durante 10 minutos.

El azúcar reductor liberado se cuantificó por reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico y la medida de la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantificó con respecto a una curva patrón de xilosa. En este ensayo, una unidad (U) de xilanasa se define como la cantidad de enzima requerida para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo.

**EJEMPLO 11****Perfil de temperatura de FoxXyn2**

La temperatura óptima de FoxXyn2 purificada se determinó por medio del ensayo de la actividad de xilanasa a temperaturas que varían entre 45 °C y 94 °C durante 10 minutos en amortiguador de citrato sódico 50 mM a pH 5,3. La actividad se informó como actividad relativa, en la que la actividad a la temperatura óptima se fijó en 100 %. El perfil de temperatura de FoxXyn2 se muestra en la Figura 19. Se encontró que FoxXyn2 tenía una temperatura óptima de 60 °C, y se encontró que retenía más de 50 % de la actividad máxima entre 40 °C y 65 °C.

**EJEMPLO 12****Termoestabilidad**

La termoestabilidad de FveXyn4 de tipo salvaje (wt) y variantes de FveXyn4 se determinó a 63 °C (véanse los datos en la Tabla 2). Se observa claramente que todas las variantes que representan números diferentes (2-4) y

combinaciones de mutaciones tienen una actividad residual más alta a 63 °C en comparación con FveXyn4, y puede concluirse que estas variantes son todas más termoestables que FveXyn4 de tipo salvaje (por ejemplo, mostradas aquí como SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 27).

## 5 Materiales y métodos

Las variantes de FveXyn4 se obtuvieron a partir de genotecas combinatorias o mediante la introducción de mutaciones específicas como se describe en el Ejemplo 1. La termoestabilidad de las variantes de FveXyn4 se midió diluyendo y preincubando las muestras de enzima en amortiguador MES 25 mM (Tween 80 al 0,00125 % - amortiguador MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 al 0,00125 % (V:V)), pH 6,0 durante 10 min a 63 °C. Después de la incubación, la actividad residual se midió por el método de la actividad de xilanasa descrito en el Ejemplo 1. La actividad medida sin preincubación se fijó en 100 %, y la actividad residual de cada variante a la temperatura respectiva se calculó con respecto a esta.

La Tabla 2 muestra 14 variantes combinatorias de FveXyn4 con una termoestabilidad significativamente mayor en comparación con FveXyn4 wt. La termoestabilidad se mide como actividad residual después de la preincubación a 63 °C durante 10 min como se describió anteriormente en la sección Materiales y métodos de este Ejemplo 12.

Tabla 2		
Variante	Mutaciones	Actividad residual a 63 °C
FveXyn4	WT	0,04
1	K79F_A217Q_T298F	0,89
2	N7D_T33V_A217Q_T298F	0,80
3	N7D_K79F_T298F	0,79
4	T33V_K79F_A217Q	0,77
5	N7D_T33V_T298Y	0,76
6	T33V_A217Q_T298Y	0,67
7	N7D_A217Q_T298F	0,65
8	N7D_T33V_A217Q	0,60
9	K79F_T298F	0,59
10	N7D_K79F	0,58
11	T33V_K79F	0,57
12	T33V_T298Y	0,55
13	N7D_T33V	0,40
14	T33V_A217Q	0,35

# REIVINDICACIONES

1. Una enzima para uso en el malteado o elaboración de cerveza, en la descomposición de material basado en grano, y/o en la separación del gluten de trigo del almidón, en la que dicha enzima es una xilanasa GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad de xilanasa, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en dos o más de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F, o W, o en la que la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1, en la que dicho fragmento tiene al menos 60 % de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 de la cual deriva el fragmento, y en la que dicha enzima es:
  - a) una enzima xilanasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 % de identidad, preferiblemente al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad, con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o
  - b) una enzima xilanasa codificada por una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos 70 % de identidad, preferiblemente al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 %, o al menos 99 % de identidad, con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No 32 o SEQ ID No. 33.
2. La enzima para uso de la reivindicación 1, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en tres o más de las posiciones indicadas: 7D, 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F o W, en la que la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1.
3. La enzima para uso de la reivindicación 1, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en todas las posiciones indicadas: 7D, 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F o W, en la que la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1.
4. La enzima para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enzima comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:
  - 25P;
  - 57Q, T o V (preferiblemente Q);
  - 62T o S (preferiblemente T);
  - 64T o S (preferiblemente T);
  - 89G, N, Q, L o M (preferiblemente G o Q, más preferiblemente, G);
  - 103M o K (preferiblemente M);
  - 115E o L (preferiblemente L);
  - 147Q;
  - 181Q, A, D o P (preferiblemente Q);
  - 193Y o N (preferiblemente Y) y/o
  - 219D o P (preferiblemente P).
5. La enzima para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enzima comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:
  - i. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
  - ii. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q y 298Y.
  - iii. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
  - iv. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
  - v. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
  - vi. 79F, 217Q y 298F;
  - vii. 7D, 33V, 217Q y 298F;
  - viii. 7D, 79F y 298F;
  - ix. 33V, 79F y 217Q;
  - x. 7D, 33V y 298Y;
  - xi. 33V, 217Q y 298Y;
  - xii. 7D, 217Q y 298F;
  - xiii. 7D, 33V y 217Q;
  - xiv. 79F y 298F;
  - xv. 7D y 79F;
  - xvi. 33V y 79F;
  - xvii. 33V y 298Y;
  - xviii. 7D y 33V; o
  - xix. 33V y 217Q.
6. La enzima para uso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha enzima comprende un polipéptido que tiene al menos 94 % de identidad con la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; en la que dicha enzima a) comprende una de las secuencias

de aminoácidos mostradas aquí como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, o SEQ ID No. 21, o b) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 %, preferiblemente al menos 98,5 %, idéntica a las secuencias de aminoácidos mostradas aquí como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, o SEQ ID No. 21, en tanto que los aminoácidos en las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 sean idénticos a los mostrados en SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20, o SEQ ID No. 21.

7. Uso de una enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en el malteado o elaboración de cerveza, en la descomposición de material basado en grano, y/o en la separación del gluten de trigo del almidón.

8. Un método para hidrolizar arabinoxilanos durante el malteado y elaboración de cerveza, en el que granos de trigo, granos de cebada, o una combinación de los mismos, o porciones de los granos de trigo y/o cebada, se mezclan con la enzima para uso en el malteado o elaboración de cerveza según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, preferiblemente en el que los arabinoxilanos son arabinoxilano insoluble en agua y arabinoxilano soluble en agua.

9. Una bebida que comprende la enzima para uso en el malteado o elaboración de cerveza según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, preferiblemente en la que la bebida es una bebida fermentada, preferiblemente en la que la bebida es cerveza o vino.

10. Un método para preparar una bebida fermentada, que comprende mezclar la enzima para uso en el malteado o elaboración de cerveza según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 con malta o adyuvante, preferiblemente en el que la bebida fermentada es cerveza.

11. Uso de la enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 en la degradación de arabinoxilano insoluble en agua y arabinoxilano soluble en agua durante el procesamiento de grano de un material basado en grano, preferiblemente en el que el material basado en grano es granos enteros, porciones de granos enteros, o mezclas de los mismos.

12. El uso de la reivindicación 11, en el que el material basado en cereales se descompone en glucosa, preferiblemente en el que la glucosa se usa posteriormente para la producción de biocombustible y/o la producción de productos bioquímicos.

13. Uso de la enzima según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para degradar arabinoxilano insoluble en agua y arabinoxilano soluble en agua durante la separación del almidón de trigo y el gluten.

14. Un método para separar una harina de cereal en fracciones de almidón y gluten, en el que el método comprende mezclar una harina de cereal, agua y la enzima para uso en la separación del gluten de trigo del almidón según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, preferiblemente en el que la harina de cereal, el agua y la enzima se mezclan simultánea o secuencialmente, preferiblemente en el que la harina de cereal y el agua se mezclan antes de mezclarlos con la enzima.

15. El método o enzima para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en el que la enzima se usa en combinación con otros componentes, preferiblemente en el que los otros componentes son una o más enzimas de la elaboración de cerveza o del malteado, enzimas de procesamiento de grano, o enzimas de separación del gluten de trigo del almidón.



FIGURA 1A  
(SEQ ID NO. 26)

mklsflytaslyaa*IP****TAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN***  
SGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK  
VIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADP  
NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVFVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL  
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN  
YNPKPAYTAVVNALR

FIGURA 1B  
(SEQ ID No. 27)

*IP****TAIEPRQAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDAT***  
***EP***  
SQGKFNFSGFDQVVNFQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVV  
GRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDY  
SLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVFVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVA  
ITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV  
VNALR

FIGURA 1C  
(SEQ ID No. 1)

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFSGFDQVVNFQQ  
NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFG  
NDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVFVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALT  
ALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKPAYTAV  
VNALR

FIGURA 2A  
(SEQ ID NO. 24)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA  
TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC  
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCCC  
AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA  
GTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA  
CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGgtatgtttattccccagacttctt  
cgaaatgactttgctaacaigtgcagGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCC  
GAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTC  
CGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCG  
ACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCTCCGTCAAGAAGTGGCT  
CAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC  
GCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTG  
CCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAA  
GGCCTGCCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAG  
AACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCC  
TGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

## FIGURA 2B

(SEQ ID NO. 25)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTGGCGGCCATTCCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC  
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCC  
 AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA  
 GTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA  
 CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGAT  
 CTTGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAAC  
 GACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGC  
 TGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTAT  
 GGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCT  
 CAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCG  
 CCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGC  
 CAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCA  
 CCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTT  
 CGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 2C

(SEQ ID NO. 2)

ATTCCACCGCCATCGAGCCGCCAGGCTGCCGACAGCCTCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC  
TACGGACCATCACCGACCCCAACCTGCTGGGCGTCGCAAGGACACCCGCCATCATCAAGGCGACTTTGGGSCC  
GTTACCCCGGAGAACTGGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTASCTTCGAC  
CAGGTTGTCAACTTTGCCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCT  
CAGTGGGTTAAGAACATCAACGCAAGGCTACTCTCAACAGGTCATTTGAGAACCACTCAACCAAGTCTTTGGA  
CGCTACAAGGCCAAGATCTACGCTGGGACGTCGTCACAGAGATCTTCGAGTGGGACGCTACCCCTCCGAAAGGAC  
TCTCACTTCAACAAGCTCTTGGCAACGAGGACTAGCTTGGCATTCGCTTCCGCGCCGCGCCAGGCTGACCCC  
AAGGCUAAGCTGTACATCAACCACTACAGGCTCGACTCCGGCAGCGCCCTCCAGGTCACCAAGGCTATGCTTCC  
TCCCTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCGCTCAGCGGCAATGGCTCTCAGACTCAGCTTGAACCCGCTGCC  
GCTGGCCAAATCCAGGCTGCTCTCACTGCCCCCGCCCAATTCCTGCTCTCAAGGAGGTTGGCATCACCGAGCTGAC  
ATCCGCACTGCCCCCGCAAGCACTAGCTACGCTCAACCAAGGCTTCCCTCAGGCTCCGCAAGTGCATTTGGTATC  
ATCGTCTGGGGTGTCTCTGACAGAACTCTTGGCCCAAGGAGCAGCAGAGCTCTGTGTGATGCTAACTACAC  
CCGAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 3A

(SEQ ID No. 28)

mklssilytaslvaa*IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN*  
*SGKWDATPSQGKFNFSGFDQVWNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK*  
*VIEHVTNNVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADP*  
*NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVFVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL*  
*ANSQVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN*  
*YNPKAAYTAVVNALR*

FIGURA 3B

(SEQ ID No. 29)

*IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATPS*  
*SQGKFNFSGFDQVWNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIEHVTNNV*  
*GRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDY*  
*LDGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVFVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSQVKEVAI*  
*TELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAV*  
*VNALR*

FIGURA 3C

(SEQ ID No. 3)

*QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATPSQGKFNFSGFDQVWNFAQQ*  
*RELKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIEHVTNNVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFG*  
*NDDYVGIAFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVFVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL*  
*ANSQVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAV*  
*VNALR*

FIGURA 4A

SEQ ID No. 30

ATGAAGCTGTCTTCCTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCCGCGGCCATTCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC  
 ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG  
 AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTAGTCTGGCACTCCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCAC  
 CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG*glatgttttcttcaactcgaactttat*  
*aatggctttactaacaatgttcag*GACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGA  
 AAGGACTCTCACTTCAACAACGTCCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCCTCCG  
 CGCTGCCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGAC  
 TCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCA  
 GCCAGGGCGTCCCCGTGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGC  
 TGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCC  
 ATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGG  
 CCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAAC  
 TCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTG  
 CTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

## FIGURA 4B

SEQ ID No. 31

ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC  
 ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG  
 AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCAC  
 CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTTAACGAGATC  
 TTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGA  
 CGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG  
 TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG  
 TTCCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCA  
 GACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC  
 AACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCA  
 ACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACC  
 GTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCCG  
 ATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

## FIGURA 4C

SEQ ID No. 4

ATTCCCAACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCTCTCCGACAGCATCAGCAASCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC  
 TACGGAAACATCACCAGCCCCAACCCTGCTCGCGCTCGCAAGGACACTGCCATCATCAAGGCTGACTTTGCGGCC  
 GTCCACCCGAGAACCTCGGTAGTGGATGCCCAGAGCCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGAC  
 CAGGTCTCAACTCTTCTCAGCAGAATCGCTCAAAGTCCAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCAGCTCCT  
 CAGTGGCTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAGGGTCATCGAGAACCACCTCACCACCTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCTGGCACTCTGTAACGACATCTTCGACTGGGAAGGTACCTCCGAAAGSAC  
 TCTGCTTCAACAAAGCTCTTCGCGACGACGACTACGTTGGCATTTGCTTCGCGCTGCCCCGAGGCTGACCCC  
 AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCTCGACTCCGGCAGCGCTCCAAAGGTCACCAAGGCGATGGTTCCC  
 TCTGTCAAGAACTGGCTCAGCCAGGGCTCCCCCTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCGGTGGC  
 GCTGGCCAAATCCAGGCTGCTCTCACTGCGCTCGCCAACTCTGCTGTGAAGGAGCTTGCCATCACCGAGCTCGAC  
 ATCCGCACTGCCCGGCCAACGACTACGCTACCTTACCAAGGCTGCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGTATC  
 ACCGTCTGGGCGGTATCTGACAGGAACCTCTTGGCGCAAGGAGCAGGACAGCTTCGTTTCGATGCTAAGTACAAC  
 CCGAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCTCGCTAA



FIGURA 5

SEQ ID No. 5

QAALISINKLIKNNKGLYYCTITDPNLLGVAKDTAVIKADFGAVTFENSGKWDATFESQGNFEGSFQVNVNEDQ  
 NGLKVRGHTLVWHSQLEFQWVKNINDKATLTKEIENHYTQVVGRIKSKIYAWGVVNEIFDWDGTLRKLSEFNNVFG  
 NDDYVGIAPFAARKALFNAMLYINDYSLDEASAKVTGGMVFSVKNLSSQGVVDGTSQSHLDPGAAGQVQGA  
 TALANSQVMEVATELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCTGTWGVVEDKNSWRKXERDRLPFDSNYPKFAVYAV  
 VNALE

FIGURA 6A

SEQ ID No. 32

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCCGAAAGGACACCGCCCTC  
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTCTGCAACTTTGCICA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCAATTGAGAACCACGTCAC  
 CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGtatgtttcttgccctcgaccttctca  
 gagatgaatttgctaacatgttcagGACGTIGTCAACGAGATCTTCGACTGGGACGGTACCCTCCG  
 AAAGGATCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCC  
 GCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGA  
 CTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTC  
 AGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCAGCTCACCTTGACCCCGGTGCCG  
 CTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACCTCTGGTGTCAAGGAGGTTGC  
 CATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTCAACCAAG  
 GCCTGCCTAACGTCCTCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAA  
 CTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCGACTCCAACATAACCCCAAGCCT  
 GCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

## FIGURA 6B

(SEQ ID NO. 33)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCACCGCCA  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCCTC  
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCACGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCCAGGTGGTCAACTTTGCTCA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCAC  
 CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCAACGAGATC  
 TTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGATCTCACTTCAACAACGCTTTCGGCAACGA  
 TGACTACGTTGGCATTGCCTTCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG  
 TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG  
 TCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCCA  
 GTCTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC  
 AACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCA  
 ACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAACGTCGCCAAGTGCATTGGTATCAC  
 CGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTT  
 GACTCCAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

## FIGURA 6C

(SEQ ID NO. 6)

ATTCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCGCCCGACAGCATCAACBAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC  
 TACGGAAACCATCACCGACCCCBACCTGCTCGGCGTCTGCAAAGGACACCGCCGTCATCAAGGCCBACITTTGGGCCC  
 GTCAACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGGCCAGGCGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTGGAC  
 CAGGTCTGCAACITTTGGTCAGCCAGAATGGCTCAAGGTCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCT  
 CAGTGGGTAAAGAACATCAAGGACAAGGCTACTCTGAACCAAGGTCATTGAGAACACCGTCACCCAGTCTGTTGGA  
 CGCTACAGGGCAGATCTACCCCTGGGACCTTGTAAACAGATCTTGGATGGGACCGTACCTTCGAAAGGAT  
 TCTCAGTTCAACAACCTCTTCCGCAACGATGACTACCTTGGCATTTGCTTCCGGCGCCCCCGCAGGCTGACCCC  
 AAGCCAAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCGCAGCCCTCCAGGTCACCAAGGGCATGCTCC  
 TCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCTCGAGCGCATTTGGCTCCAGTCTCAGCTTACCCCGGTCC  
 GCTGCCAAGTCCAGGCTGCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGCTGTCAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGAC  
 ATCCGCBCTGCCCGCCCCAAGGACTAGCGCCCGCTCAGCAAGGCTGCTTAACCTTCCCCAGTGCATTTGTTATC  
 ACCGTCTGGGCTCTCTGTGACAAGAACTCTTGGGCAAGGAGCAGCAGGCTTCTGTTGGATCTTCAACTACAAC  
 CCCAAGCCTGCTTCACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 7

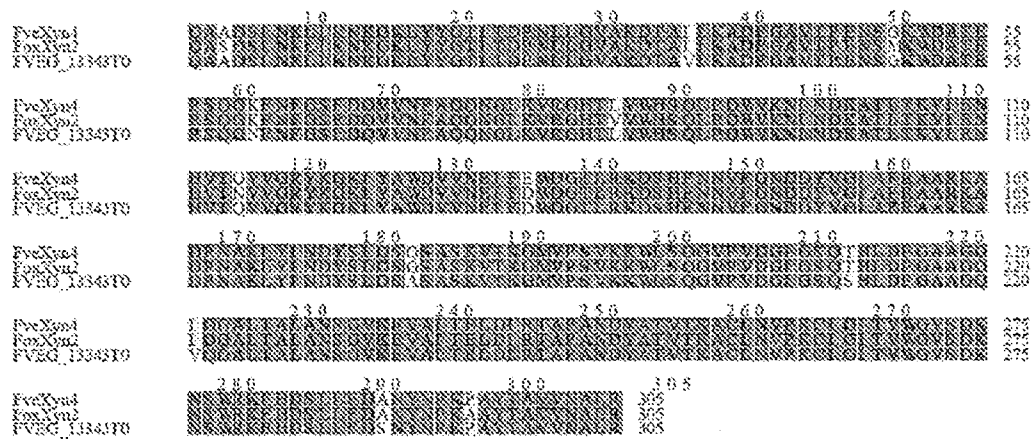


FIGURA 8

## SEQ ID No. 7

> Secuencia codificante de la enzima variante A (1 pb-987 pb, directa) 987 pb

ATSAAGCTGTCTTCTTCTCTACACCGGCTCGCTGGTCCGGGCCATTCCGACCGCCATCGAGGCCCGCC  
AGCCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CCCCCTTCTCGGGCTGCAAAAGGACCTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCGTTACCCCCGAGAAC  
TCGGGCAAGTGGGACGGCACCGAGCCCGACAGGGCAAGTTCACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
ACTTTGCCGACGAGAAATGGCCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
GCTTAAGAACATCAACGCAAGGCTATGCTGACCAAGGTCAATCGAGAACGACGTCACCCACTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCTTGGGACGTCTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCTCCGAA  
AGGACTCTCACTTCAACGAGGTCTTGGGCAAGGACGACTACGTTGGCATTTGCCCTTCGGCGCCGCGCCAA  
GGCTGACCCCAACGCGCAAGCTGTACATCAAGGACTACAGCCTCGACTCCGAGAGCGGCTCCAGGTCACC  
AAGGCTATGGTTCCCTACGTCAAGAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA  
CTCACTTGAACCCCGGTCAAGGCTCCGCAAAATCCAGGGTGGTCTCACTGCGCCTCGCCCAATCTCTGGTCAA  
GGAGTTGGCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCAAGGACTACGCTACCGTCAACCAAGGCG  
TGCTCAACGTCCCGAAGTGCATTGGTATCACTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
AGCAGGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTGTCAACGCTCT  
CCGCTAA

## SEQ ID No. 8

> Secuencia codificante de la enzima variante A (1 pb-987 pb, directa) 987 pb

ATSAAGCTGTCTTCTTCTCTACACCGGCTCGCTGGTCCGGGCCATTCCGACCGCCATCGAGGCCCGCC  
AGCCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CCCCCTTCTCGGGCTGCAAAAGGACCTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCGTTACCCCCGAGAAC  
TCGGGCAAGTGGGACGGCACCGAGCCCGACAGGGCAAGTTCACTTCGACCAGGTTCCGACCAGGTTGTCA  
ACTTTGCCGACGAGAAATGGCCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTG  
GCTTAAGAACATCAACGCAAGGCTATGCTGACCAAGGTCAATCGAGAACGACGTCACCCACTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCTTGGGACGTCTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCTCCGAA  
AGGACTCTCACTTCAACGAGGTCTTGGGCAAGGACGACTACGTTGGCATTTGCCCTTCGGCGCCGCGCCAA  
GGCTGACCCCAACGCGCAAGCTGTACATCAAGGACTACAGCCTCGACTCCGAGAGCGGCTCCAGGTCACC  
AAGGCTATGGTTCCCTACGTCAAGAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA  
CTCACTTGAACCCCGGTCAAGGCTCCGCAAAATCCAGGGTGGTCTCACTGCGCCTCGCCCAATCTCTGGTCAA  
GGAGTTGGCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCAAGGACTACGCTACCGTCAACCAAGGCG  
TGCTCAACGTCCCGAAGTGCATTGGTATCACTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
AGCAGGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTGTCAACGCTCT  
CCGCTAA

FIGURA 8 continuación

SEQ ID No. 9

> Secuencia codificante de la enzima variante C (1 pb-987 pb, directa) 987 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTGGCGGCCATTCCACCGCCATCGAGCCCGGCC  
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CCCTCTGCTCGGCGCTCGCAAGGACCTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCGCTTACCCCCGAGAAC  
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
ACTTTGCCGACAGCAATGGGCTCTACGTCGGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACCGCCAGCTCCCTCAGTG  
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTCAGAACCACGTCACCCCAAGTCGTTGGA  
CGCTACAGGGCAAGATCTACGCTGGGACCTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACCGTACCCCTCCGAA  
AGGACTCTCACTTCAACAAGCTCTTCGGCAACGACGACTACCTTGGCATTGGCTTCCGCGCGCGCCGCAA  
GGCTGACCCCAAGGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGGCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAGGTCACC  
AAGGSTATGCTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACCGCATTTGGCTCTCAGA  
CTCACCTTGACCCCGGTCAAGCTGGCCAAATCCAGGCTGGCTCTCACTGCCCTCGCCAAATCTGGTGTCAA  
GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCGCCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC  
TGCTCAACGTCGCCAAGTGCATTTGGTATCACCGTCTGGGCTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
AGCAGGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTAGGCTGTTGTCAACGCTCT  
CCGCTAA

SEQ ID No. 10

> Secuencia codificante de la enzima variante D (1 pb-987 pb, directa) 987 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTGGCGGCCATTCCACCGCCATCGAGCCCGGCC  
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CAACCTGCTCGGCGCTCGCAAGGACCTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCGCTTACCCCCGAGAAC  
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAAGCCAGGGCAAGTTCACTTCACCGAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
ACTTTGCCGACAGCAATGGGCTCTACGTCGGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACCGCCAGCTCCCTCAGTG  
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTCAGAACCACGTCACCCCAAGTCGTTGGA  
CGCTACAGGGCAAGATCTACGCTGGGACCTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACCGTACCCCTCCGAA  
AGGACTCTCACTTCAACAAGCTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGGCTTCCGCGCGCGCCGCAA  
GGCTGACCCCAAGGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGGCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAGGTCACC  
AAGGSTATGCTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACCGCATTTGGCTCTCAGA  
CTCACCTTGACCCCGGTCAAGCTGGCCAAATCCAGGCTGGCTCTCACTGCCCTCGCCAAATCTGGTGTCAA  
GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCGCCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC  
TGCTCAACGTCGCCAAGTGCATTTGGTATCACCGTCTGGGCTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
AGCAGGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTAGGCTGTTGTCAACGCTCT

CCGCTAA

FIGURA 8 continuación

SEQ ID No. 11

> Secuencia codificante de la enzima variante E (directa) 987 pb

ATGAAAGCTGTCTTCTTTTCCTCTACACCGCCTCGCTCGCTCGCGGCCATTCCACACCGCCATCGAGCCCGGCC  
 AGGCTGCGGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAAGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCAACCGACCC  
 CCCCCGCTCGCGCTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGCACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCGAGGCCAGGCCAAGTTCAACTTCACCCAGCTTCGACCCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCACAGAGAATGGCCCTCTACGTCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCAGCGGCCAGCTCCCTCACTG  
 GGTAAAGAACATCAACGACAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACACGTCACUCAAATCTCTTGA  
 CGCTACAAAGGCAAGATCTACGCTGGGACGTCCTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCCTCCGAA  
 AGGACTCTCACTTCAACAAGCTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTCGCTTCCGCGCCGCGCGCAA  
 GGCCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCGAGCGCCTCCAAGGTCACC  
 AAGGCTATGGTTCCCTCCCTCAASAAGTGGCTCAGCCAGCGCGTTCCCTCCAGCGCATTCGCTCTCAGA  
 CTCACCTTGACCCCGGTCAGGCTGGCCAAATCCAGCGGTGCTCTCACTGCGCTCGCCAAATCTGGGTCTCAA  
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAAAGACTACGCTACGCTCACCAGGCC  
 TGGCTCAACGTCGCCAAGTGCATTGCTATCACCGTCTCGGCTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCCCAAGG  
 AGCAAGACAGCTCTTCTGTTGGATGCTAAGTACAACCCCAAGCTGCTTACTACGCTGTTTCTCAACGCTCT  
 CCGCTAA

FIGURA 9

SEQ ID No. 12

> Enzima variante A (121 pb - 1159 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTCTCTACACCGGCTCGCTGGTCSGGGCCATTTCCCACCGCCATCGAGCCCGGCC  
AGGCTGCCGACAGCATCCGACAAGCTGATCAAGAACAAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CCCCCTGCTCGGGCTCCGCAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCCGCTTACCCCGGAGAAC  
TGGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGGCGGCAAGTTACCTTCGGTAGCTTCGACCAAGTTGTCA  
ACTTTGCCGACGAGAAATGGCTCTACGTCGGAGGTCAACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTTAGAAACCACTTCACCCAACTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCCTGGGTATGTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA  
CATGTTTCAGGACGTCGTCACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCTTCGAAAGGACTCTCACTTCAACC  
AGGCTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCTTGGCTTCGGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA  
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGAGAGCGCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC  
GTCAAGAAATGGCTCAGCCAGGGCGTTCCGTCGACGGCATTTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGGTCTCACTGCCCTCGCCAAATTCGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA  
GCTCGACATCCGCACTGCCCGGCCCAACGACTACGCTACCGTCAACCAAGGCTGCCCTCAACGTCGCCAAG  
TGCATTGCTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCAGCAGCTCTTCTGT  
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

SEQ ID No. 13

> Enzima variante B (121 pb - 1159 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTCTCTACACCGGCTCGCTGGTCSGGGCCATTTCCCACCGCCATCGAGCCCGGCC  
AGGCTGCCGACAGCATCCGACAAGCTGATCAAGAACAAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CCCCCTGCTCGGGCTCCGCAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCCGCTTACCCCGGAGAAC  
TGGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGGCGGCAAGTTACCTTCACCAAGCTTCGACCAAGTTGTCA  
ACTTTGCCGACGAGAAATGGCTCTACGTCGGAGGTCAACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTG  
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTTAGAAACCACTTCACCCAACTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCCTGGGTATGTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA  
CATGTTTCAGGACGTCGTCACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCTTCGAAAGGACTCTCACTTCAACC  
AGGCTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCTTGGCTTCGGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA  
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGAGAGCGCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC  
GTCAAGAAATGGCTCAGCCAGGGCGTTCCGTCGACGGCATTTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGGTCTCACTGCCCTCGCCAAATTCGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA  
GCTCGACATCCGCACTGCCCGGCCCAACGACTACGCTACCGTCAACCAAGGCTGCCCTCAACGTCGCCAAG  
TGCATTGCTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCAGCAGCTCTTCTGT  
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA



FIGURA 9 continuación

SEQ ID No. 14

> Enzima variante C (121 pb - 1159 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGGCGCCATTCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCGGACAGCATCGACAGCTGATCAAGCAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAAACCATCACCGACCC  
 CCGCTGCTGCTGGCGCTCGCAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCCGAGCAGAAATGGCCCTCTACGTCGGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTAAAGAACATCAACGACAAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAGTCCGTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCTGGGTATGTTTTATTCCCGCCAGACTTCTTGAATGACTTTGCTAA  
CATGTTCAAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGCTACCCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA  
 ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTTGCCCTTCGGCGCCGCCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA  
 GCTGTACATCAACGACTACAGCTCGACTCCGGCAGCGGCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC  
 GTCAAGAAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCGCTCGACGGCAATGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
 AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGTCTCTCACTGCCCTCGCCAAATCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA  
 GCTCGACATCCGCACTGCCCGCCAGGACTACGCTACCGTCACCAAGGCTGGCTCAACGTCCCCAAG  
 TGCATTTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAAGAACTCTTGGCGCAAGGACACGACAGTCTTCTGT  
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCGCTGCTTACTACGCTGTTTTCAAAGCTCTCCGCTAA

SEQ ID No. 15

> Enzima variante D (46 pb - 1084 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGGCGCCATTCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCGGACAGCATCGACAGCTGATCAAGCAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAAACCATCACCGACCC  
 CAAGCTGCTGCGCGCTCGCAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACTTCACCAAGTTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCCGAGCAGAAATGGCCCTCTACGTCGGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTAAAGAACATCAACGACAAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAGTCCGTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCTGGGTATGTTTTATTCCCGCCAGACTTCTTGAATGACTTTGCTAA  
CATGTTCAAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGCTACCCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA  
 ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTTGCCCTTCGGCGCCGCCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA  
 GCTGTACATCAACGACTACAGCTCGACTCCGGCAGCGGCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC  
 GTCAAGAAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCGCTCGACGGCAATGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
 AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGTCTCTCACTGCCCTCGCCAAATCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA  
 GCTCGACATCCGCACTGCCCGCCAGGACTACGCTACCGTCACCAAGGCTGGCTCAACGTCCCCAAG  
 TGCATTTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAAGAACTCTTGGCGCAAGGACACGACAGTCTTCTGT  
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCGCTGCTTACTACGCTGTTTTCAAAGCTCTCCGCTAA

FIGURA 9 continuación

SEQ ID No. 16

> Enzima variante E (46 pb - 1084 pb, directa) 1039 pb

ATGGAAGCTGTCTTCTTCTTCTTCTACACCGGCTCGCTGGTCTGCTGCGCCATTCCACCGGCGCATCGAGCCCCGCG  
 AGGCTGCGGACAGCATCGACAGCTGATCAAGAACAAAGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCAAGGACCC  
 CCCCCCTGCTCGGCGCTGSCAAAGGACGTGCGCATCATCAAGGCGGACTTTGGCGCGGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACCGCCACCGAGCCCGAGCCAGGGCAAGTTCACCTTCACCAAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCCAGCAGAAATGGGCTCTACGTCCGAGCTCAACTCTGGTCTGGCACGGGCGAGCTCCCTCAGTG  
 GGTTAAGAACATCAACGACAAAGGCTACTCTGACCAAGGTCAATTGAGAACCCAGTCAACCAAGTGGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAGATCTTACGCTGGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA  
CATGTTTCAGGACGTCTGTAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA  
 ACGTCTTCCGCAAGGACGACTACGTTGGCATTCGCTTCCGCGCGCGCCGCAAGGCTCAACCCCAAGCCCAA  
 GCTGTACATCAACGACTACAGGCTCGACTCGGGCAGCGGCTCCAAGGTCAACCAAGGATATGGTTCCCTCC  
 GTCAAGAAAGTGGCTCAGCCAGGGCGGTTCCCGTCGACGGGATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
 AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGGCTCTCACTGCCCTCGCCCAATCTGGTGTCAAGGAGGTTGGCATCACCGA  
 GCTCGACATCGGCACTGCCCCGSCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCTTGGCTCAACGTCCCCAAG  
 TGCATTGCTATCACGGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGACGACAGTCTTCTGT  
 TCGATGCTAACTACAAACCCCAAGGCTGCTTACTAGGCTGTGTGCAACGCTCTCCGCTAA

**FIGURA 10**

**SEQ ID No. 17**

**Enzima variante A madura 306 aa**

QAADSIDKLIKKNKGKLYYGTITDPFLLGVAKDVAIIKADFGAVTFENSSGKWLDATEPQQGKFTFTSFDQVV  
NFAQQNGLYVRGHTLVWBGQLPQWVKNIINDKAMLTKVIENTHVTQLVGRYKGTIYAWDVVNEIFEWDTLR  
KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTGCMVPYVKKWLSQGVFVDGIGSQ  
THLDPGQAFQIQGALTALANSQVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIIGITVWGVSDKNSWRK  
EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**SEQ ID No. 18**

**Enzima variante B madura 306 aa**

QAADSIDKLIKKNKGKLYYGTITDPFLLGVAKDVAIIKADFGAVTFENSSGKWLDATEPQQGKFTFTSFDQVV  
NFAQQNGLYVRGHTLVWBSQLPQWVKNIINDKAMLTKVIENTHVTQLVGRYKGTIYAWDVVNEIFEWDTLR  
KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTGCMVPYVKKWLSQGVFVDGIGSQ  
THLDPGQAFQIQGALTALANSQVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIIGITVWGVSDKNSWRK  
EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**SEQ ID No. 19**

**Enzima variante C madura 306 aa**

QAADSIDKLIKKNKGKLYYGTITDPFLLGVAKDVAIIKADFGAVTFENSSGKWLDATEPQQGKFTFTSFDQVV  
NFAQQNGLYVRGHTLVWBGQLPQWVKNIINDKATLTIVIENTHVTQVVGRYKGTIYAWDVVNEIFEWDTLR  
KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTGCMVPSVERWLSQGVFVDGIGSQ  
THLDPGQAGQIQGALTALANSQVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIIGITVWGVSDKNSWRK  
EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**SEQ ID No. 20**

**Enzima variante D madura 306 aa**

QAADSIDKLIKKNKGKLYYGTITDPFLLGVAKDVAIIKADFGAVTFENSSGKWLDATEPQQGKFTFTSFDQVV  
NFAQQNGLYVRGHTLVWBGQLPQWVKNIINDKATLTIVIENTHVTQVVGRYKGTIYAWDVVNEIFEWDTLR  
KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTGCMVPSVERWLSQGVFVDGIGSQ  
THLDPGQAGQIQGALTALANSQVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIIGITVWGVSDKNSWRK  
EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**SEQ ID No. 21**

**Enzima variante E 306 aa**

QAADSIDKLIKKNKGKLYYGTITDPFLLGVAKDVAIIKADFGAVTFENSSGKWLDATEPQQGKFTFTSFDQVV  
NFAQQNGLYVRGHTLVWBGQLPQWVKNIINDKATLTIVIENTHVTQVVGRYKGTIYAWDVVNEIFEWDTLR  
KDSHFNQVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTGCMVPSVERWLSQGVFVDGIGSQ  
THLDPGQAGQIQGALTALANSQVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIIGITVWGVSDKNSWRK

EDSLLIFDANYINPKFAYVAVNALR\*

FIGURA 11

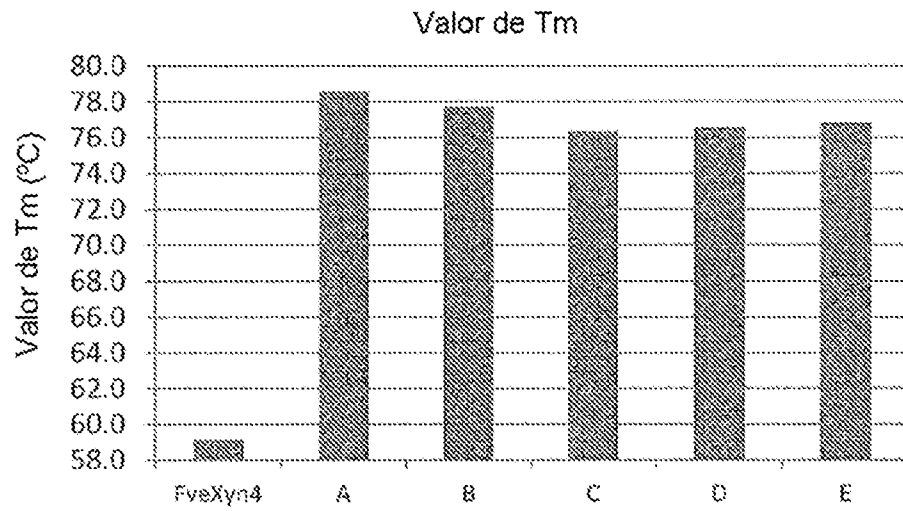


FIGURA 12

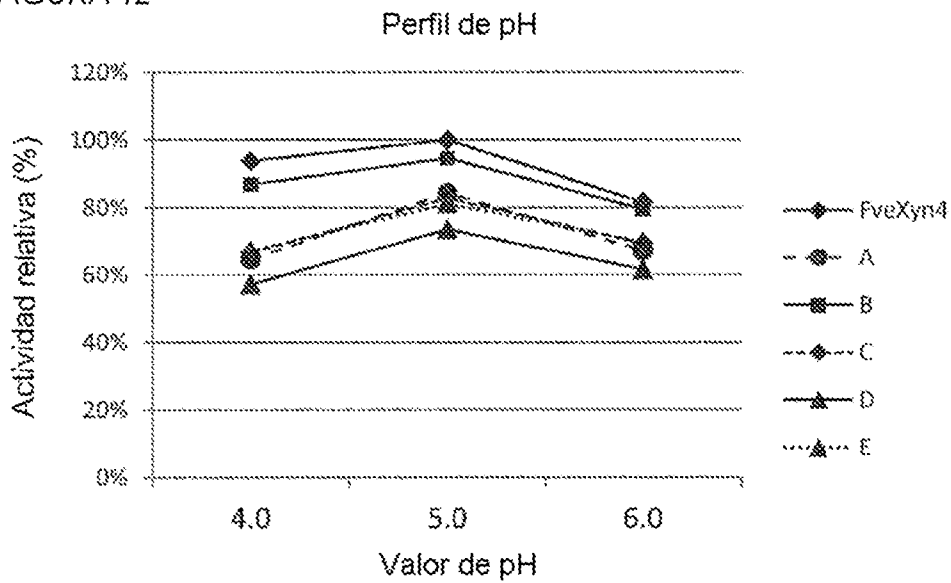


FIGURA 13a

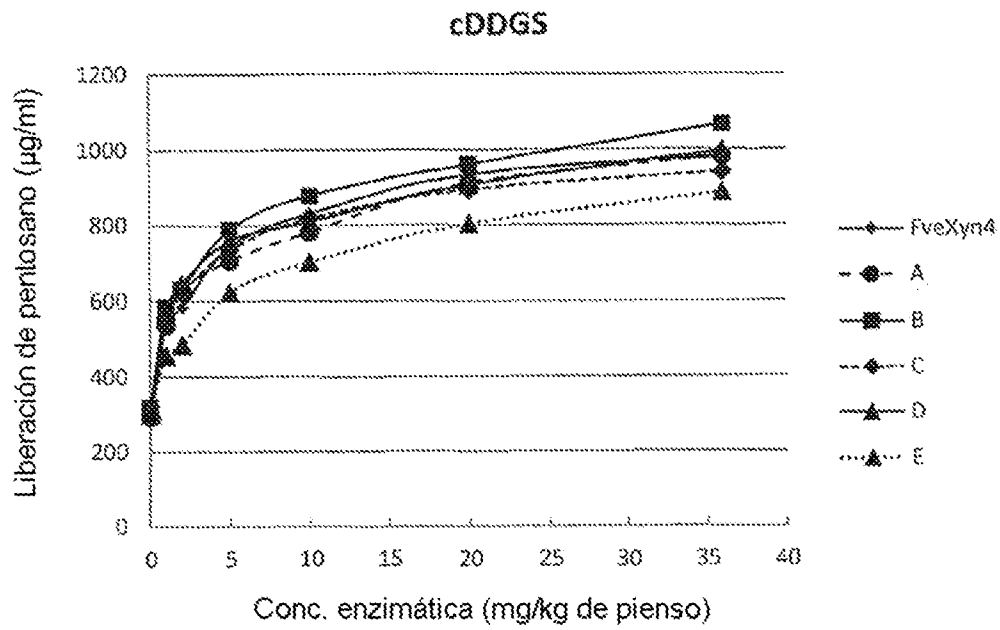


FIGURA 13b

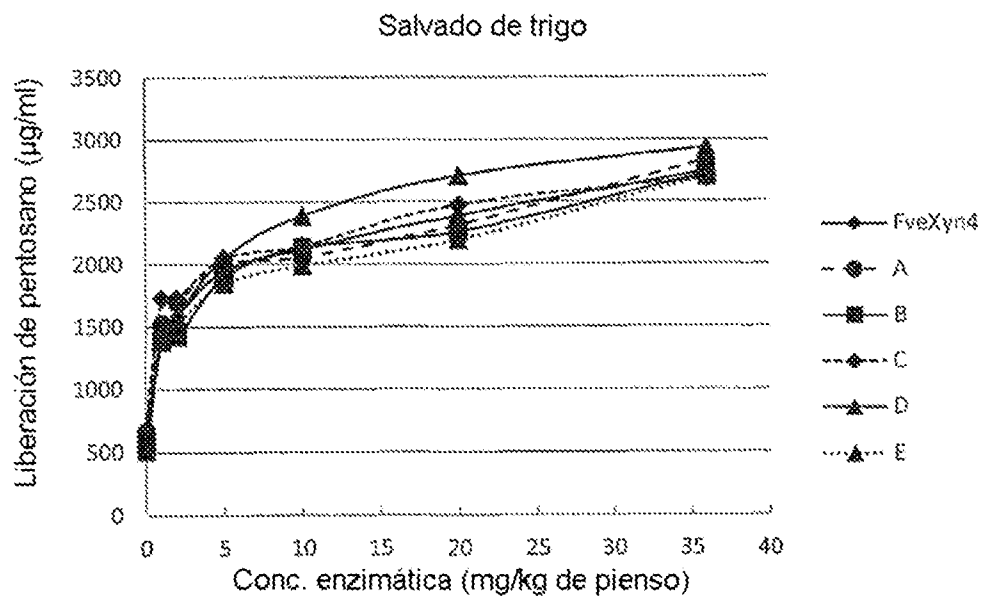


FIGURA 14

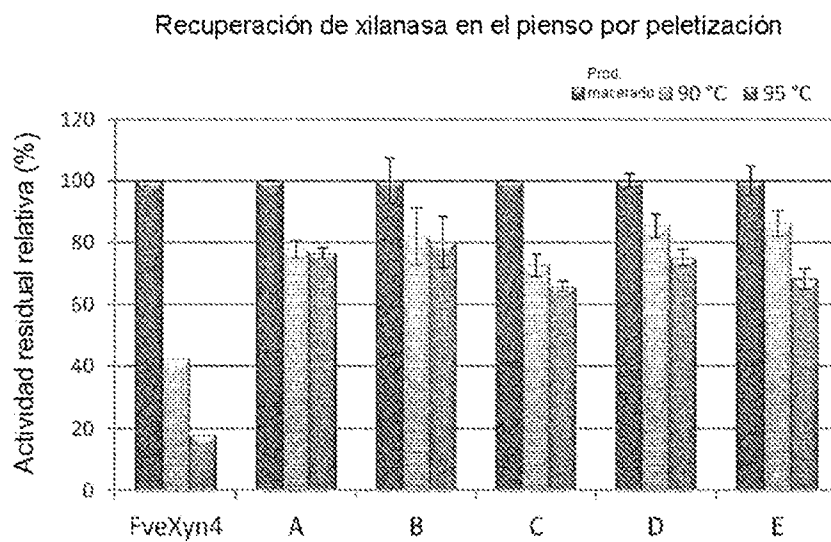
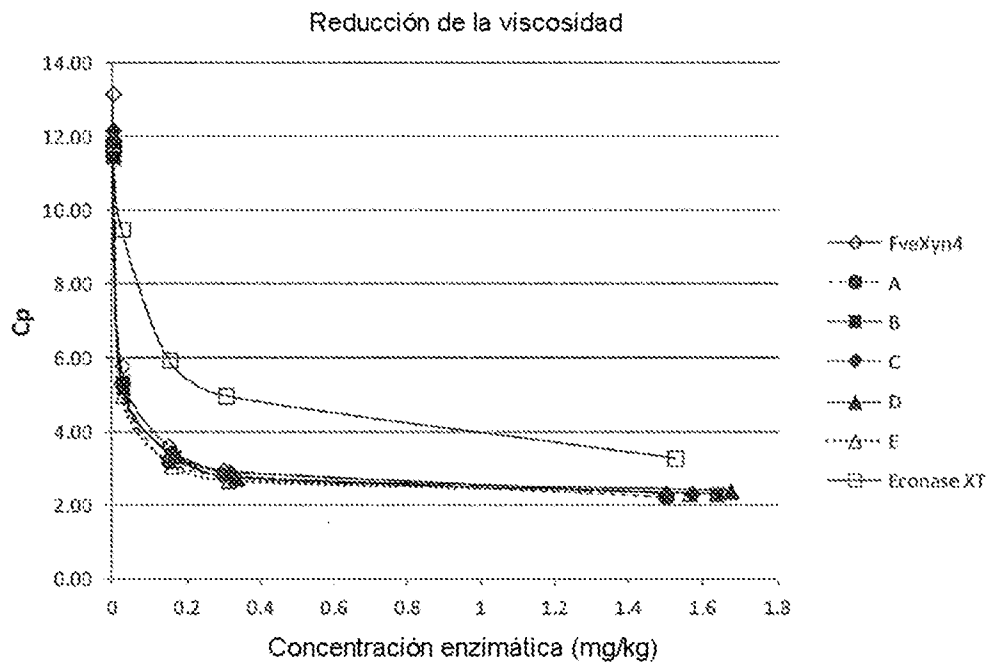


FIGURA 16

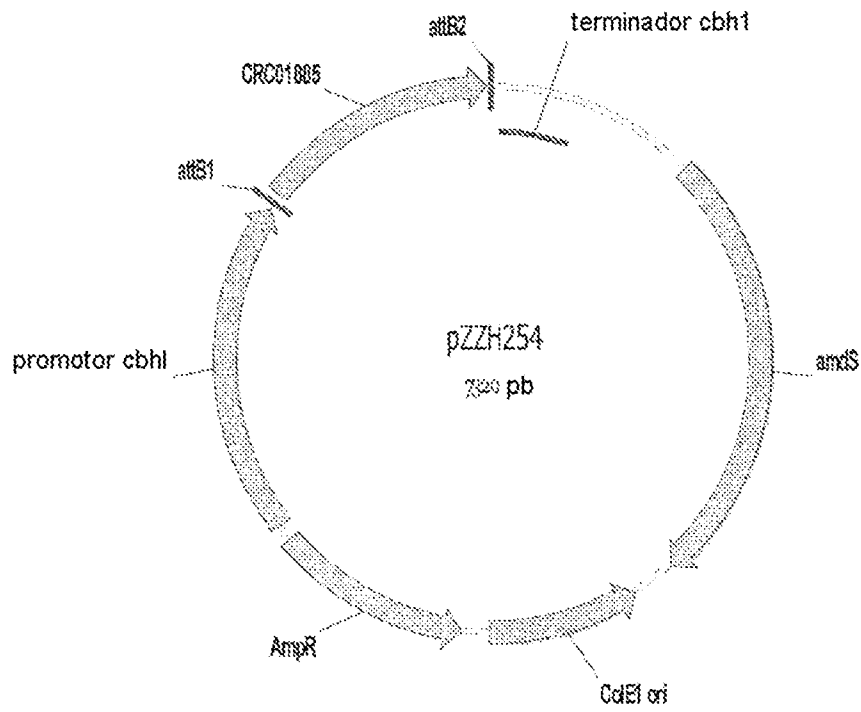


FIGURA 17

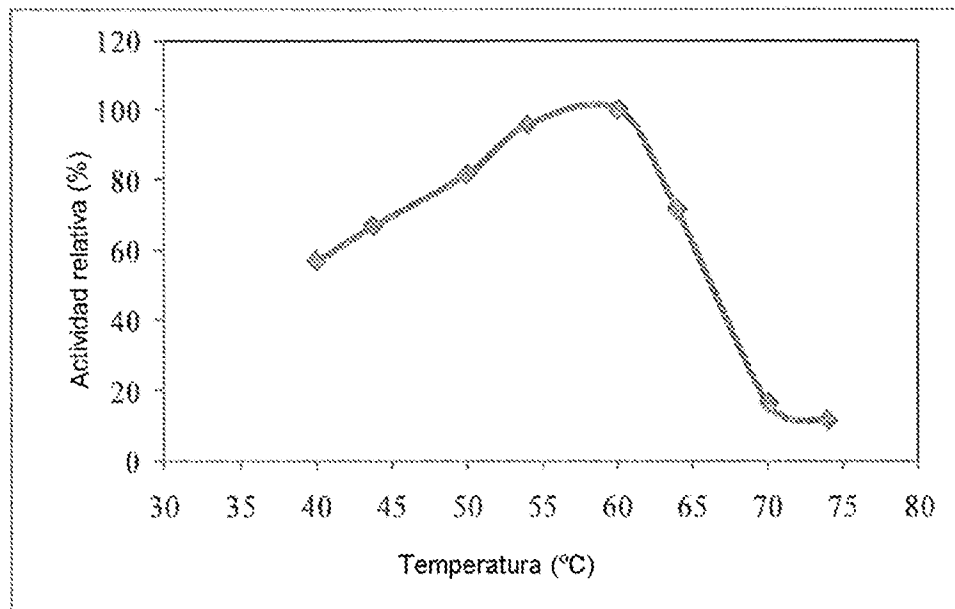


FIGURA 18

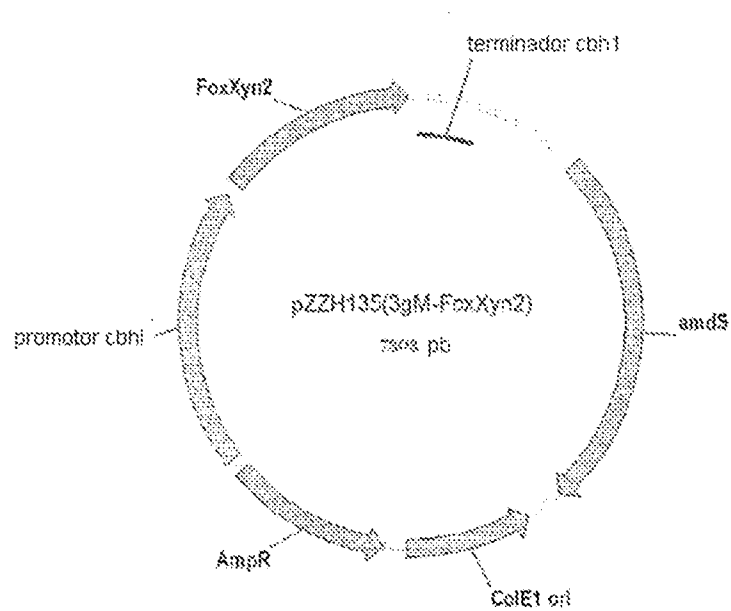


FIGURA 19

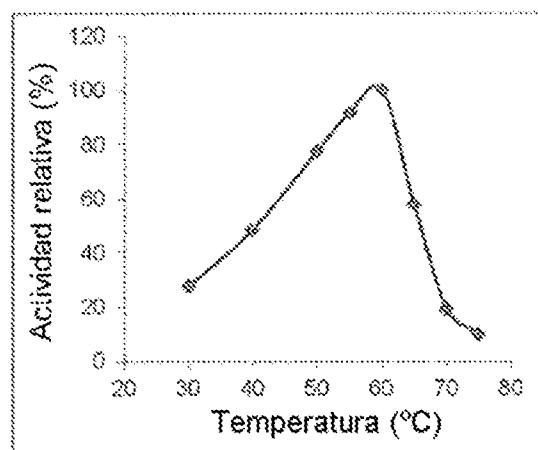




FIGURA 20

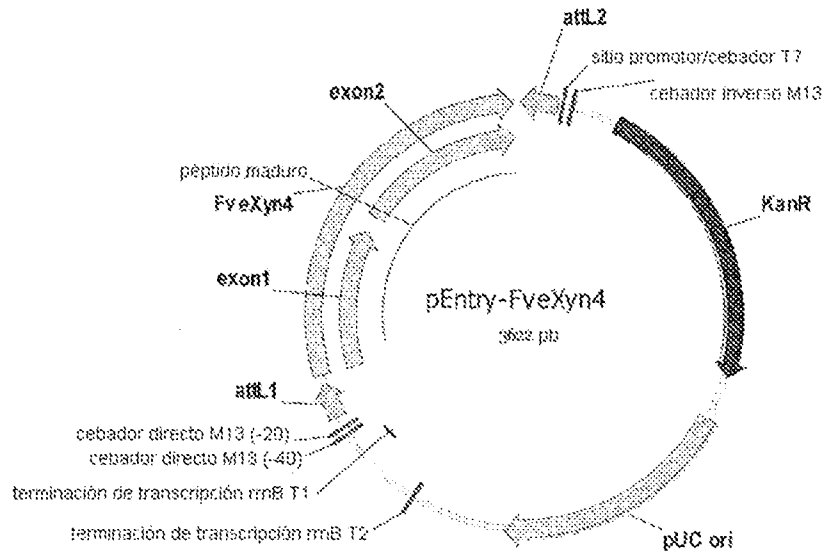


FIGURA 21

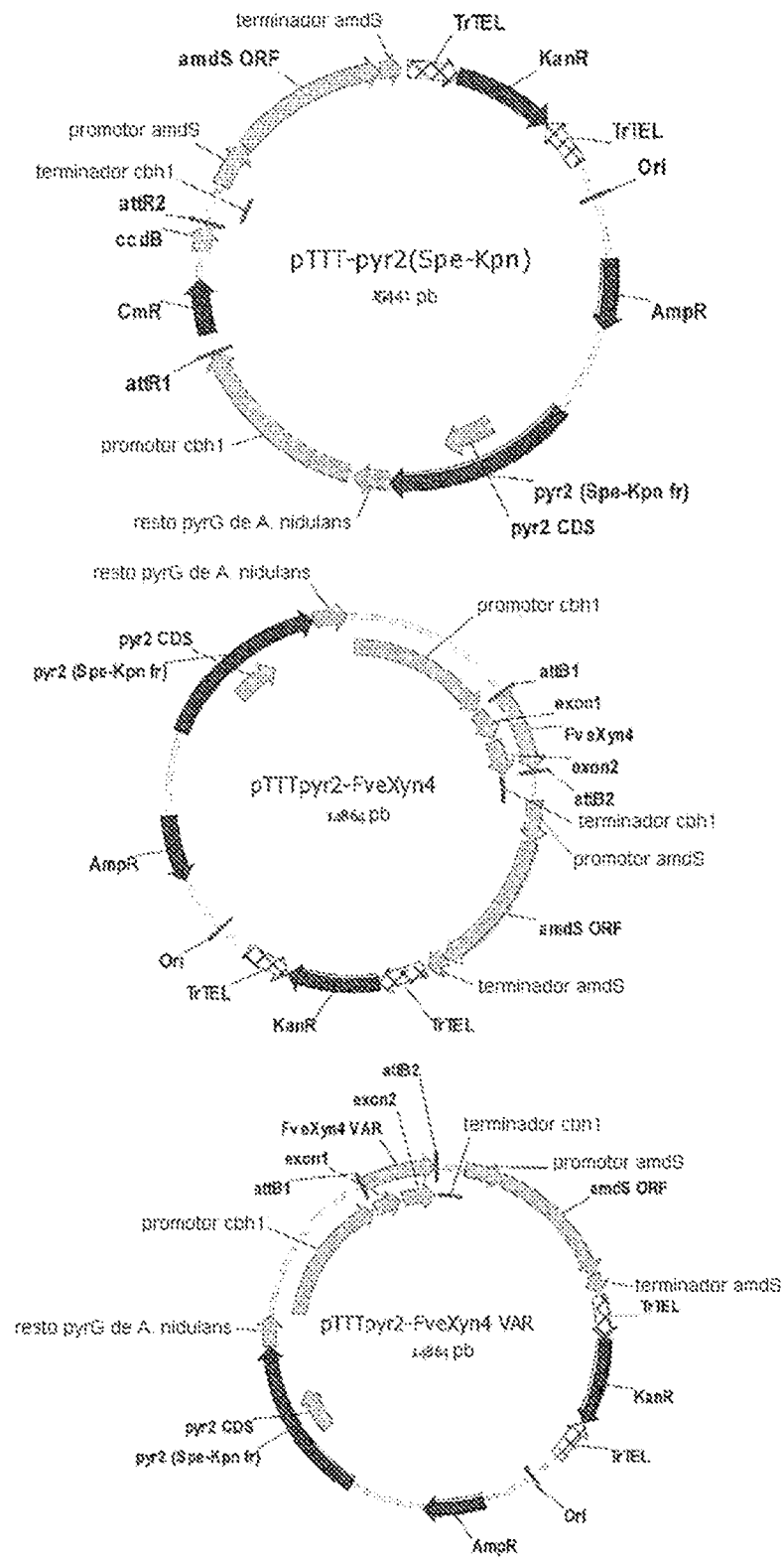


FIGURA 22

