

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 481**

51 Int. Cl.:

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/98 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2000 E 00967736 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **18.06.2003 EP 1319079**

54 Título: **Xilanasa de talaromyces**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.02.2013

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Ludwigshafen
67056 Ludwigshafen , DE**

72 Inventor/es:

**VAN DEN HOMBERGH, JOHANNES, PETRUS,
THEODORUS, W.;
VAN DER LAAN, JAN-METSKE y
DARAN, JEAN-MARC, GEORGES**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 394 481 T3

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

DESCRIPCIÓN

Xilanasas de *Talaromyces*

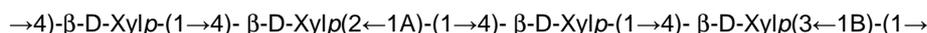
Campo de la Invención

5 La presente invención se relaciona con unas xilanasas novedosas, tales como las xilanasas de *Talaromyces* y su uso en la degradación del xilano en la celulosa. Las xilanasas encuentran uso en el horneado, en pienso para animales (para mejorar la conversión del pienso) y en producción del papel.

Antecedentes de la invención

10 La composición de una pared de la célula vegetal es compleja y variable y contiene varios biopolímeros de carbohidratos. Los polisacáridos principalmente se encuentran en la forma de cadenas largas de celulosa (el componente estructural principal de la pared de la célula vegetal), hemicelulosa (que comprende varias cadenas β -xilano, tales como xiloglucanos) pectina y lignina. Las hemicelulosas más abundantes son los xilanos y sus derivados tales como arabinoxilano y xiloglucano.

15 Las hemicelulosas vegetales incluyen xilano, arabinoxilano, glucuronoarabinoxilano y xiloglucano. El xilano (Registro CAS No. 9014-63-5) consiste de un esqueleto de unidades D-xilopiranosilo β -1,4-ligadas, opcionalmente sustituidas con cadenas laterales tales como residuos de arabinosa y/o ácido glucurónico. La estructura es:



(Xylp = unidad xilopiranosilo; A = unidad α -(4-O)-metil-(D-glucuronopiranosil), en algún momento un acetil; y B = unidad α -(L-arabinofuranosil), algunas veces un acetil).

20 Los xilanos pueden representar más del 30% del peso seco de las plantas terrestres. Por lo tanto, el xilano es un componente importante de los materiales de fuentes naturales que se utilizan en los procesos industriales que van de horneado, mejora de la conversión del pienso para animal y producción del papel.

25 Existen diferencias básicas entre monocotiledóneas (por ejemplo cereales y pastos) y dicotiledóneas (por ejemplo trébol, colza y soja) y entre la semilla y las partes vegetativas de la planta. Las monocotiledóneas se caracterizan por la presencia de un complejo de arabinoxilano como el principal esqueleto de la hemicelulosa, y la estructura principal de las hemicelulosas en dicotiledóneas es un complejo de xiloglucano. Las concentraciones más altas de pectina se encuentran en las dicotiledóneas que en las monocotiledóneas. Las semillas por lo general son altas en sustancias pépticas pero relativamente bajas en material celulósico.

30 Las enzimas degradantes de la celulosa se utilizan para la elaboración de material vegetal en alimento así como aplicaciones en pienso o como un alimento o aditivo de pienso debido a su capacidad para actuar sobre los sustituyentes principales de la pared de la célula vegetal.

35 La mayoría de las enzimas que degradan la celulosa, disponibles para la industria parecen ser xilanasas con un peso molecular relativamente bajo y una estabilidad moderada a mayores temperaturas. Sin embargo, para ciertas aplicaciones es deseable utilizar una xilanasas con una termoestabilidad relativamente alta. Si una xilanasas es para ser utilizada como un aditivo de pienso para animal, entonces se prefiere una termoestabilidad alta debido a las condiciones de alta temperatura aplicadas durante el peletizado del pienso para animal.

Resumen de la Invención

Actualmente, una xilanasas novedosa se provee, la cual es capaz de escindir el β -D-xilano tal como se presenta en el material vegetal. La xilanasas también puede ser capaz de hidrolizar el arabinoxilano (o tiene actividad de arabinoxilanasas) y una aril- β -D-xilopiranosida (o tiene actividad xilosidasas).

40 En consecuencia, la presente invención provee una β -polipéptido xilanasas (aislada) que comprende:

(i) la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2; o

(ii) una variante de al menos 90 % de identidad de la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2, que es capaz de escindir el xilano; o

(iii) una variante de la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2, que tiene hasta 50 sustituciones de aminoácidos y que es capaz de escindir el xilano, o

(iv) un fragmento de la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2, que es capaz de escindir el xilano.

5 De acuerdo con otro aspecto de la invención se provee un polinucleótido que comprende:

(a) la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasas o el complemento de esta o

(b) una secuencia codificante para un polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente;

10 (c) un fragmento de al menos 100 nucleótidos de la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasas o el complemento de esta;

(d) una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con la secuencia codificante de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasas

(e) la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasas o el complemento de esta o la secuencia madura de Seq ID No. 1 modificada por hasta 100 sustituciones del nucleótido;

15 (f) una secuencia codificante para una xilanasas que se degenera como resultado del código genético para la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 o el complemento de esta.

(g) una secuencia que codifica para un polipéptido que tiene actividad de xilanasas, que es:

(1) la secuencia codificante de los nucleótidos 69 a 1224 de SEQ ID No. 1 o

20 (2) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a una secuencia definida en (1); o

(h) una secuencia complementaria a un polinucleótido definido en (g).

La invención también provee:

- un vector (por ejemplo de expresión) que comprende un polinucleótido de la invención y que puede ser capaz de expresar un polipéptido de la invención;

25 - una línea celular que comprende un vector de la invención;

- un método para producir un polipéptido de la invención, método que comprende el mantenimiento de una línea celular de la invención, bajo condiciones apropiadas para obtener la expresión del polipéptido y, si es necesario, aislar el polipéptido;

30 - un método de la degradación β -D-xilano, el método que comprende poner en contacto un material que comprende β -D-xilano con un polipéptido de la invención; y

- un método para la identificación de un compuesto que modula la actividad de xilanasas, método que comprende poner en contacto un polipéptido de la invención con un compuesto de prueba en la presencia de β -D-xilano y seguimiento o detección de cualquier modulación de actividad.

Breve Descripción de las Secuencias

35 SEQ ID No. 1, es una secuencia de ADN codificante para una la xilanasas de la invención a partir del *Talaromyces emersonii*;

SEQ ID No. 2, es la secuencia de aminoácidos de la xilanasas; y

SEQ ID Nos. 3 y 4, son cebadores de PCR artificiales que hibridan a SEQ ID No. 1.

Descripción Detallada de la Invención

A. Polinucleótidos

La presente invención provee un polinucleótido (por ejemplo aislado y/o purificado) codificante para un polipéptido de la invención. La presente invención provee así un polinucleótido codificante para una xilanasasa cuya secuencia de aminoácidos se figura en SEQ ID No. 2 (tal como la secuencia madura de los aminoácidos 23 a 408). La presente invención además provee un polinucleótido codificante para un polipéptido que tiene sustancial homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID No. 2. También se incluye un polinucleótido seleccionado de:

- (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, de los polinucleótidos 69 a 1224) establecida en SEQ ID No. 1, o el complemento de esta;
- (b) un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótido que se degenera como resultado del código genético a un polinucleótido definido en (a), (b) o (c).

Un polinucleótido de la invención también incluye un polinucleótido que:

(a) codifica un polipéptido que tiene actividad de xilanasasa, cuyo polinucleótido es:

- (1) la secuencia codificante de SEQ ID No. 1 (por ejemplo, de los polinucleótidos 69 a 1224);
- (2) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a una secuencia definida en (1) o
- (b) es una secuencia complementaria a un polinucleótido definido en (a).

Las referencias a SEQ. ID. No. 1, puede ser sustituida por la secuencia codificante madura (polinucleótidos 69 a 1224) a menos que el texto lo requiera de otra manera.

20 Secuencias capaces de hibridar

El término "capaz de hibridar" significa que el polinucleótido diana de la invención puede hibridar al ácido nucleico utilizado como una sonda (por ejemplo la secuencia de nucleótidos establecida en SEQ. ID No.1, o un fragmento de esta o el complemento de esta) en un nivel significativamente por encima de la base. La invención también incluye las secuencias de nucleótidos que codifican para la xilanasasa o variantes de esta, así como secuencias de nucleótidos que son complementarias a esta. La secuencia de nucleótido puede ser ARN o ADN y por lo tanto incluye ADN genómico, ADN sintético o ADNc. Preferiblemente la secuencia de nucleótidos es una secuencia de ADN y más preferiblemente, una secuencia de ADNc. Por lo general un polinucleótido de la invención comprende una secuencia contigua de nucleótidos que es capaz de hibridar bajo condiciones selectivas con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante (por ejemplo madura) de SEQ ID No. 1. Tales nucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica¹.

Un polinucleótido de la invención puede hibridar con la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante (por ejemplo madura) de SEQ ID No.1 en un nivel significativamente por encima de la base. La hibridación base puede ocurrir, por ejemplo, debido a otros ADNcs presentes en una biblioteca de ADNc. El nivel de señal (por ejemplo generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificante o complemento de la secuencia codificante) es por lo general al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, tan intenso como las interacciones entre otros polinucleótidos y la secuencia codificante (por ejemplo madura) de SEQ ID No. 1. La intensidad de la interacción se puede medir, por ejemplo, por radiomarcación de la sonda, por ejemplo con ³²P. La hibridación selectiva, por lo general se puede lograr utilizando condiciones de baja severidad (cloruro de sodio 0.3M y citrato de sodio 0.03M a aproximadamente 40°C), severidad media (por ejemplo, cloruro de sodio 0.3M y citrato de sodio 0.03M a aproximadamente 50°C) o severidad alta (por ejemplo, cloruro de sodio 0.3M y citrato de sodio 0.03M a aproximadamente 60°C). La hibridación se puede realizar bajo cualquiera de las condiciones apropiadas conocidas en la técnica¹ y, como guía, severidad baja puede ser 2 x SSC a 55°C, severidad media puede ser 0.5 a 1.0 x SSC a 60°C y severidad alta puede ser 0.1 o 0.2 x SSC a 60°C o superior (por ejemplo a 68°C), todas a 0.5% de SDS.

45 Modificaciones

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser mono o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de ellos uno o más nucleótidos modificados o sintéticos. Un número de diferentes tipos de modificaciones a los polinucleótidos se conocen en la técnica. Estos incluyen esqueletos metilfosfonato y fosforotioato y/o adición de cadenas acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula.

Para los propósitos de la presente invención, se debe entender que los polinucleótidos descritos en este documento se pueden modificar por cualquier método disponible en la técnica.

5 Se debe entender que los expertos pueden, utilizar técnicas de rutina, hacer sustituciones de nucleótidos que no afectan la secuencia del polipéptido codificada por los polinucleótidos de la invención para reflejar el uso del codón de cualquier organismo huésped particular, por ejemplo en el cual los polipéptidos de la invención se van a expresar.

10 La secuencia codificante (por ejemplo madura) de SEQ ID No. 1, se puede modificar por sustituciones de nucleótidos, por ejemplo de o hasta 1, 2 o 3 a 10, 25, 50 o 100 sustituciones. El polinucleótido puede ser alternativo o adicionalmente modificado por una o más inserciones y/o deleciones y/o mediante una extensión en cualquiera o ambos extremos. El polinucleótido modificado generalmente codifica un polipéptido que tiene actividad de xilanasas. Se pueden hacer sustituciones degeneradas y/o se pueden hacer sustituciones que darían lugar a una sustitución de aminoácido conservadora cuando la secuencia modificada se traduce, por ejemplo como se discute con referencia a los polipéptidos más adelante.

Homólogos

15 Una secuencia de nucleótido que es capaz de hibridar selectivamente a (por ejemplo el complemento de) la secuencia de ADN codificante de SEQ ID No. 1 (o nucleótidos 69-1224) puede tener al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de la secuencia (u homología) con la secuencia codificante de SEQ ID No. 1. Esto puede ser sobre una región de al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 60, por ejemplo al menos 100, al menos 200, más preferiblemente al menos 300 nucleótidos contiguos o de manera óptima sobre la longitud completa de SEQ ID No. 1.

20 Cualquier combinación de los grados de homología mencionados anteriormente y tamaño mínimo pueden ser utilizados para definir los polinucleótidos de la invención, siendo preferidas las combinaciones más estrictas (i.e. homología superior en longitudes mayores). De tal manera, por ejemplo un polinucleótido que tiene al menos 80% o 90% de homología sobre 25, preferiblemente sobre 30 nucleótidos forma un aspecto de la invención, así como un polinucleótido que tiene al menos 90% de homología en más de 40 nucleótidos.

25 Los homólogos de las secuencias de polinucleótido (o proteína) por lo general tienen al menos 95 % de homología, preferiblemente al menos 97% o 99% de homología, por ejemplo sobre una región de al menos 20, 25, 30, 100 más nucleótidos contiguos (o aminoácidos). La homología se puede calcular sobre la base de identidad del aminoácido (algunas veces denominado como "homología dura").

30 Por ejemplo, el Paquete UWGCG provee el programa BESTFIT, que se puede utilizar para calcular la homología (por ejemplo utilizado en sus ajustes por defecto⁵). Los algoritmos PILEUP y BLAST se pueden utilizar para calcular secuencias línea arriba u homología (tales como identificar secuencias equivalentes o correspondientes, por ejemplo en sus ajustes por defecto^{6,7}).

35 El Software para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero identificar los pares de secuencia de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia query que ya sea corresponde o satisface alguna puntuación del umbral estimado positivo T cuando se alinea una palabra de la misma longitud en una secuencia de bases de datos. T se denomina como el umbral de la puntuación de la palabra vecina^{6,7}. Estos aciertos de la palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs que las contienen. Los aciertos de la palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia para la medida de la puntuación de alineamiento acumulativa se puede incrementar. Las extensiones para los aciertos de la palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativo disminuye por la cantidad X de su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos del residuo de puntuación negativa; o el final de cada secuencia se alcanza. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza por defecto una longitud de la palabra (W) de 11, las alineaciones de la matriz⁸ de la puntuación BLOSUM62 (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

45 El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias⁹. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que provee una indicación de la probabilidad por la cual una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la suma más pequeña de probabilidad en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menos de aproximadamente 1, preferiblemente menos de aproximadamente 0.1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.01, y más preferiblemente menos de aproximadamente 0.001.

Cebadores y Sondas

5 Los polinucleótidos de la invención incluyen y se pueden utilizar como un cebador, por ejemplo un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, o los polinucleótidos se puede clonar en los vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos o hasta 20, 25, 30 o 40, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud. Por lo general tendrán hasta 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150, 200 o 300 nucleótidos de longitud, o este número (incluso hasta tan pocos nucleótidos como 5 o 10 nucleótidos) corto de la secuencia codificante (por ejemplo madura) de SEQ ID No. 1.

10 En general, los cebadores serán producidos por medios sintéticos, implicando una fabricación por etapas de la secuencia del ácido nucleico deseado de un nucleótido en un momento. Las técnicas para lograr esto, utilizando técnicas automatizadas son fácilmente disponibles en la técnica. Ejemplos de cebadores de la invención se establecen en SEQ ID Nos 3 y 4.

15 Los polinucleótidos más largos generalmente serán producidos utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará hacer un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15-30 nucleótidos) para una región de la xilanasa que se desea para clonar, poniendo los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenido de una célula diana (por ejemplo levadura, bacterias, planta, procariota u hongos), preferiblemente de una cepa *Talaromyces*, realizando una reacción en cadena de la polimerasa bajo condiciones que provocan la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (por ejemplo purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperando el ADN amplificado. Los cebadores se pueden diseñar para contener sitios de reconocimiento de enzima de restricción apropiado, de manera que el ADN amplificado se puede clonar en un vector de clonación apropiado.

20 Tales técnicas se pueden utilizar para obtener toda o parte de la secuencia de xilanasa descrita en este documento. Los clones genómicos correspondientes al ADNc de SEQ ID No. 1 o el gen de xilanasa que contiene, por ejemplo, intrones y regiones promotoras están dentro de la invención también y también se pueden obtener de una manera análoga (por ejemplo medios recombinantes, PCR, técnicas de clonación), iniciando con ADN genómico de una célula de hongos, levaduras, bacterias, plantas o procariota.

25 Los polinucleótidos o cebadores pueden llevar un marcador revelador, por ejemplo un marcador radioactivo o no-radioactivo. Los marcadores apropiados incluyen radioisótopos tales como ³²P o ³⁵S, marcadores de enzimas, u otros marcadores de proteínas tales como biotina. Tales marcadores se pueden adicionar a polinucleótidos o cebadores de la invención y se pueden detectar utilizando técnicas conocidas *per se*.

30 Los polinucleótidos, marcados o sin marcar se pueden utilizar en pruebas basadas en ácido nucleico para la detección o secuenciación de xilanasa o una variante de esta en una muestra (por ejemplo hongos). Tales pruebas para la detección generalmente comprenden poner una muestra (por ejemplo hongos) (sospechosa de) que contiene ADN en contacto con una sonda o cebador de la invención bajo condiciones de hibridación y detección de cualquier dúplex formado entre la sonda y el ácido nucleico en la muestra. Tal detección se puede lograr utilizando técnicas tales como PCR o inmovilizando la sonda sobre un soporte sólido, retirando el ácido nucleico en la muestra que no se hibrida con la sonda, y luego la detección del ácido nucleico que se hibridó con la sonda. De manera alternativa, la muestra del ácido nucleico se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, y la cantidad de sonda unida a dicho soporte se puede detectar.

40 Las sondas de la invención convenientemente se pueden empacar en la forma de un kit de prueba en un contenedor apropiado. En tales kits la sonda se puede unir a un soporte sólido donde el formato de ensayo para el cual el kit se diseña requiere tal enlace. El kit también puede contener los reactivos apropiados para tratar la muestra que se hibrida, hibridando la sonda con el ácido nucleico en la muestra, reactivos control, instrucciones, y similares.

Preferiblemente, el polinucleótido de la invención se obtiene del mismo organismo como el polipéptido, tal como un hongo, en particular un hongo del género *Talaromyces*.

45 Los polinucleótidos de la invención también incluyen variantes de la secuencia de SEQ ID No. 1, que tienen actividad de xilanasa. Las variantes se pueden formar mediante adiciones, sustituciones y/o deleciones y pueden tener la capacidad de escindir un polímero β-D-xilano.

Producción de polinucleótidos

50 Los polinucleótidos que no tienen 100% de identidad con (por ejemplo la secuencia codificante madura de) SEQ ID No. 1 pero caen dentro del alcance de la invención, se pueden obtener en un número de maneras. De tal manera, las variantes de la secuencia de xilanasa descritas en este documento se pueden obtener por ejemplo, mediante la hibridación de bibliotecas de ADN genómico fabricadas de un rango de organismos, por ejemplo aquellos discutidos como fuentes de los polipéptidos de la invención. Además, se pueden obtener otros homólogos de hongos, plantas o procariota de xilanasa y tales homólogos y fragmentos de estos en general serán capaces de hibridar con SEQ ID No. 1. Tales secuencias se pueden obtener mediante la hibridación de bibliotecas de ADNc o bibliotecas de ADN

genómico de otras especies, y la hibridación de tales bibliotecas con sondas que comprenden toda o parte de SEQ ID. 1 bajo condiciones de severidad media a alta (como se describe anteriormente). Las sondas de ácido nucleico que comprenden toda o parte de SEQ ID No. 1, se pueden utilizar para hibridar las bibliotecas de ADNc de otras especies, tales como aquellas descritas como fuentes para los polipéptidos de la invención.

5 Las especies homólogas también se pueden obtener utilizando PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para secuencias diana dentro de las variantes y homólogos codificantes para una secuencia de aminoácido conservada. Los cebadores pueden contener una o más posiciones degeneradas y serán utilizadas en condiciones de severidad menores que las utilizadas para clonar las secuencias con cebadores de secuencia únicos contra secuencias conocidas.

10 De manera alternativa, tales polinucleótidos se pueden obtener mediante mutagénesis de sitio dirigido de las secuencias de xilanasas o variantes de esta. Esto puede ser útil donde por ejemplo los cambios del codón silencioso se requieren para las secuencias para optimizar las preferencias del codón de una célula huésped particular en la cual las secuencias de polinucleótidos están siendo expresadas. Otros cambios de secuencia se pueden desear con el fin de introducir sitios de reconocimiento de la enzima de restricción, o para alterar la propiedad o función de los
15 polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

La invención incluye polinucleótidos bicatenarios que comprenden un polinucleótido de la invención y su complemento.

La presente invención también provee los polinucleótidos codificantes para los polipéptidos de la invención descritos a continuación. Dado que tales polinucleótidos serán útiles como secuencias para la producción recombinante de polipéptidos de la invención, no es necesario que ellos sean capaces de hibridar con la secuencia de SEQ ID No. 1, aunque esto generalmente será deseable. De lo contrario, tales polinucleótidos se pueden marcar, utilizar, y hacer como se describe anteriormente, si se desea. Los fragmentos de ADN se pueden preparar utilizando la técnica de PCR con cebadores específicos.^{33,34}

B. Polipéptidos.

25 La presente invención se relaciona con una xilanasas (por ejemplo (sustancialmente) purificada y/o aislada) y variantes de esta. Los polipéptidos de la invención pueden consistir esencialmente de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 2, o una parte de esta (tal como la secuencia madura de las posiciones 23 a 408), o una variante de esta. Los polipéptidos también pueden ser codificados por un polinucleótido de la invención como se describe anteriormente. Las referencias para SEQ. ID. No. 2 puede ser sustituida con la secuencia madura sola (residuos Ala²³ a Leu⁴⁰⁸) a menos que el contexto lo requiera de otra manera.
30

Los polipéptidos de la invención pueden ser activos en ambos arabinoxilano y aril-β-D-xilosidos (tal como tener actividad arabinoxilanasas y xilosidasas).

Un polipéptido de la invención puede estar en una forma aislada o una forma sustancialmente purificada. Se entenderá que el polipéptido se puede mezclar con portadores o diluentes que no interfieran con el propósito pretendido y/o la función del polipéptido e incluso ser considerado como sustancialmente aislada. Por lo general comprenderá el polipéptido en una preparación en la cual más del 20%, por ejemplo más del 30%, 40%, 50%, 80%, 90%, 95% o 99%, en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención. Estas son composiciones relativamente puras: para algunas aplicaciones el polipéptido puede estar presente en la composición en hasta un 10%, 5%, 2%, 1% o incluso no más de 0.5%. Los métodos de rutina se pueden emplear para purificar y/o sintetizar las proteínas de acuerdo con la invención¹. Para algunas formulaciones (por ejemplo para uso no farmacéutico) la cantidad del polipéptido presente puede ser pequeña, por ejemplo de 0.01 a 10%, tal como de 0.1 a 5%, o 2% o incluso de 0.2 a 1%.
35
40

Preferiblemente, el polipéptido de la invención se obtiene de un microorganismo que posee un gen codificante para una enzima con actividad de xilanasas. Más preferiblemente el microorganismo es un hongo, y de manera óptima un hongo filamentoso. Los organismos preferidos por lo tanto son del género *Talaromyces*, tales como de la especie *Talaromyces emersonii* (por ejemplo CBS 393.64 o 814.70).
45

Actividad

Un polipéptido de la invención puede tener una o más de las siguientes características, a saber, que:

(1) posea actividad de β-D- xilanasas;

50 (2) tiene un rango de pH óptimo entre 2 a 6, tal como de 3 a 5, de manera óptima de 3.5 a 5.0;

(3) tiene actividad óptima a una temperatura entre 50°C a 95°C, tal como 70 a 90°C, de manera óptima de 75 a 85°C;

(4) tiene un peso molecular (desglicosilado) entre 30 a 50 kDa, preferiblemente de 35 a 45 kDa, de manera óptima de 40 a 44 kDa o (glicosilado) entre 50 a 75 kDa, preferiblemente de 55 a 70 kDa, de manera óptima de 60 a 66 kDa; y/o

(5) tiene un punto isoeléctrico entre 3.0 a 3.6.

El polipéptido puede tener la actividad de EC.3.2.1.8. Preferiblemente el polipéptido es de la Familia 10 (anteriormente del tipo-F).

La "actividad de xilanasa" se define como la capacidad de escindir celulosa o un polímero de β -D-xilano (por ejemplo como se encuentra en las plantas por ejemplo avena o cebada). Por lo tanto, la actividad permite la escisión de β -D-xilano, tales como entre unidades adyacentes de xilopiranosilo terminal y/o no-terminal. Preferiblemente, la escisión ocurre en un enlace [xilopiranosilo (1-4) xilopiranosilo]. El polipéptido, preferencialmente puede dividirse entre dos unidades adyacentes (por ejemplo no-sustituidas). Por lo tanto puede tener endo actividad (i.e. ser una endoxilanasa). El sustrato polímero puede o no ser sustituido. También puede tener exo actividad (i.e. ser una exoxilanasa), tal como escisión de las unidades xilopiranosilo terminales. Preferiblemente el polipéptido no tendrá actividad glucanasa.

Los polipéptidos de la invención también pueden ser activos (o mostrar actividad) en arabinoxilano. El arabinoxilano es un subconjunto de xilano, con cadenas laterales L-arabino-furanosil ligadas al C-2 o C-3, o ambos, de los residuos de la cadena principal xilos. El arabinoxilano tiene el Registro CAS No. 98513-12-3. Puede tener la estructura (1 \rightarrow 4)- β -D-xilano con 3-ligadas β -L-arabinosa ramificadas. Este tipo de xilano normalmente se encuentra en xilano de avena espelta.

Esta actividad es la capacidad de hidrolizar arabinoxilano sin tratar. Esto significa que el arabinoxilano no se ha tratado o modificado, por ejemplo no ha sido tratado con una arabinofuranosidasa. Esta enzima puede retirar las cadenas laterales de arabinosa. Los polipéptidos de la invención son capaces de hidrolizar (escindir) el arabinoxilano que no ha sido tratado previamente con arabinofuranosidasa.

El arabinoxilano se puede encontrar en avena espelta, y en esta especificación la actividad del polipéptido (EXU, así como la actividad de PAHBAH) se determina en el arabinoxilano a partir de harina de trigo (con una relación arabinosa: xilosa de 41:59). Un ensayo para el arabinoxilano (como el sustrato) se describe más adelante en los Ejemplos.

Los polipéptidos de la invención también pueden tener actividad xilosidasa, por ejemplo ser capaz de hidrolizar (por ejemplo aril)- β -D-xilosidos sustituidos (también conocidos como xilopiranosidos). Por ejemplo, pueden ser capaces de hidrolizar 4-metilumbel-liferil- β -D-xilopiranosida (Registro CAS No. 6734-33-4, obtenido de Sigma Chemical Co). Esta actividad es la capacidad de liberar el marcador fluorescente del sustrato. También puede hidrolizar (ser activo en) 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-xilopiranosida (Registro CAS No. 207606-55-1). La combinación de la actividad en tanto arabinoxilano y un aril- β -D-xilosida es inusual^{36,37} y es una combinación novedosa de actividades para un polipéptido que tiene actividad de xilanasa.

Variantes y Homólogos

Un polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID No. 2 o una secuencia sustancialmente homóloga, o un fragmento de cualquier secuencia y puede tener actividad de xilanasa. En general, se prefiere la secuencia de aminoácidos que ocurre naturalmente mostrada en SEQ ID No. 2.

En particular, el polipéptido de la invención puede comprender:

- a. la secuencia del polipéptido (madura) de SEQ ID No. 2 (residuos 23 a 408) o la secuencia total de SEQ ID No. 2;
- b. una proteína con al menos 90, al menos 95, al menos 98 o al menos 99% de identidad de la secuencia con (a).

Una variante puede ser una que ocurre naturalmente, por ejemplo en células vegetales, hongos, bacterias o levaduras y que pueden funcionar de una manera similar a la proteína de SEQ ID No. 2, por ejemplo tiene actividad de xilanasa. De manera similar un homólogo de la especie de la proteína será la proteína equivalente que ocurre naturalmente en otras especies y que pueden funcionar como una xilanasa. Las variantes incluyen variantes alélicas ya sea de la misma cepa como el polipéptido de la invención o de una cepa diferente, pero del mismo género, o de las mismas especies.

Las variantes y especies homólogas se pueden obtener siguiendo los procedimientos descritos en este documento para la producción del polipéptido de SEQ ID No. 2 y realizando dichos procedimientos en una fuente de célula apropiada, por ejemplo una célula vegetal, bacteria, levadura u hongo. También será posible utilizar una sonda como se define anteriormente para hibridar bibliotecas fabricadas de células vegetales, levaduras, bacterias u hongos con el fin de obtener clones incluyendo las variantes o especies homólogas. Los clones se pueden manipular por técnicas convencionales para generar un polipéptido de la invención que luego se puede producir por técnicas recombinantes o sintéticas conocidas *per se*.

El polipéptido de la invención preferiblemente tiene al menos 90% de identidad de la secuencia con la proteína de SEQ ID No. 2, más preferiblemente al menos 95%, al menos 97% o al menos 99% de identidad de la secuencia para esta, por ejemplo sobre una región de al menos 40, 60, 100, 150, 200, 300 o 400 aminoácidos contiguos o sobre la longitud completa de SEQ ID No. 2.

La secuencia del polipéptido de SEQ ID No. 2 y de las variantes y especies homólogas, por lo tanto pueden ser modificadas para proveer los polipéptidos de la invención. Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer, por ejemplo de o hasta 1, 2 o 3 a 10, 20, 30, 50 sustituciones. El mismo número de deleciones o inserciones también se pueden hacer. Estos cambios se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función del polipéptido y aún así puede resultar en una enzima activa. El polipéptido modificado generalmente conserva la actividad como una xilanasas.

Los polipéptidos de la invención incluyen fragmentos de los polipéptidos de longitud completa mencionados anteriormente y de variantes de estos, incluyendo fragmentos de la secuencia establecida en SEQ ID No. 2. Tales fragmentos por lo general conservan la actividad como una xilanasas. Los fragmentos pueden tener al menos 50, 60, 70, 80, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de largo o pueden tener este número de aminoácidos cortos de la secuencia de longitud completa (mostrada en SEQ ID No. 2). Los fragmentos o variantes comprenden o representan una región de enlace β -D-xilano o una región de la escisión de β -D-xilano.

Los polipéptidos de la invención, si es necesario, se pueden producir por medios sintéticos aunque por lo general se harán de forma recombinante como se describe a continuación. Se pueden modificar, por ejemplo mediante la adición de residuos de histidina o una etiqueta T7 para ayudar a su identificación o purificación o mediante la adición de una secuencia señal para promover su secreción de una célula.

El término "variantes" se refiere a polipéptidos que pueden tener el mismo carácter esencial o funcionalidad biológica básica como la xilanasas, e incluyen variantes alélicas. El carácter esencial de la xilanasas es que es una enzima que puede escindir los enlaces 1-4 en β -D-xilano. Un polipéptido que tiene el mismo carácter esencial como la xilanasas se puede identificar utilizando un ensayo de degradación de la celulosa como se describe más adelante.

Las variantes de SEQ ID No.2 también incluyen secuencias que varían de SEQ ID No.2 pero que no se derivan necesariamente de la proteína xilanasas que ocurre naturalmente. Estas variantes se pueden describir como que tienen un % de homología a la SEQ ID No.2 o que tiene un número de sustituciones dentro de esta secuencia. De manera alternativa una variante se puede codificar por un polinucleótido que hibrida a SEQ ID No 1.

Las variantes se pueden definir de manera similar a las variantes de SEQ ID No. 1. De tal manera las variantes pueden comprender secuencias de variantes derivadas de otras cepas de *Talaromyces*. Otras variantes se pueden identificar de otras cepas de *Talaromyces* mediante de la búsqueda de la actividad de xilanasas y la clonación y secuenciación como antes. Las variantes pueden incluir la deleción, modificación o adición de aminoácidos únicos o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de proteína, siempre que el péptido mantenga la funcionalidad biológica básica de la xilanasas.

Las sustituciones conservadoras se pueden hacer, por ejemplo de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí. Preferiblemente, las sustituciones no afectan el plegamiento o actividad del polipéptido.

45

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

Modificaciones

5 Los polipéptidos de la invención se pueden modificar químicamente, por ejemplo modificados post-translacionalmente. Por ejemplo, pueden ser glicosilados (una o más veces, por los mismos azúcares o diferentes) o comprenden residuos de aminoácidos modificados. También se pueden modificar, mediante la adición de residuos de histidina (para ayudar a su purificación) o mediante la adición de una secuencia señal (para promover la inserción en la membrana celular). El polipéptido pueden tener una o más extensiones (N) amino- o (C) carboxil-terminal, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un péptido ligador pequeño de hasta aproximadamente 20-25

10 residuos, o una extensión (pequeña) que facilita la purificación, tal como una poli-histidina o etiqueta T7, un epitope antigénico o un dominio de enlace¹⁴ (por ejemplo maltosa) (por ejemplo en el C-terminal). Estas extensiones pueden o no ser adicionados vía un ligador.

Un polipéptido de la invención se puede marcar con un marcador revelador. El marcador revelador puede ser cualquier marcador apropiado el cual permite que el polipéptido sea detectado. Los marcadores apropiados incluyen radioisótopos, por ejemplo ¹²⁵I, ³⁵S, enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y ligadores tales como biotina.

15

Los polipéptidos se pueden modificar para incluir aminoácidos que ocurren no-naturalmente o para incrementar la estabilidad del polipéptido. Cuando las proteínas o péptidos se producen mediante medios sintéticos, tales aminoácidos se pueden introducir durante la producción. Las proteínas o péptidos también se pueden modificar después de, ya sea una producción de síntesis o recombinante.

20 Los polipéptidos de la invención también se pueden producir utilizando, o comprender (uno o más) D-aminoácidos. En tales casos los residuos de aminoácidos pueden ser ligados utilizando la secuencia convencional N a C, como se describe en esta solicitud.

Un número de modificaciones de cadena lateral se conocen en la técnica y se pueden hacer a las cadenas laterales de las proteínas o péptidos de la presente invención. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos por alquilación reductiva, mediante la reacción con un aldehído seguido por la reducción con NaBH₄, amidinación con metilacetimidato o acilación con anhídrido acético.

25

Las secuencias proporcionadas por la presente invención también se pueden utilizar como materiales iniciales para la construcción de enzimas de "segunda generación". Las xilanasas de "segunda generación" pueden ser aquellas que han sido alteradas mediante técnicas de mutagénesis (por ejemplo mutagénesis de sitio dirigido), que tienen propiedades que difieren de aquellos de xilanasas de tipo salvaje o xilanasas recombinantes tales como aquellas

30 propiedades que difieren de aquellos de xilanasas de tipo salvaje o xilanasas recombinantes tales como aquellas actividad de xilanasas de la presente invención. Por ejemplo, la temperatura o pH óptimo, actividad específica, afinidad del sustrato o termoestabilidad se pueden alterar con el fin de ser más apropiados para la aplicación en un proceso definido.

Los aminoácidos esenciales a la actividad de la xilanasas de la invención, y por lo tanto preferiblemente sometida a la sustitución, se puede identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis por barrido de alanina¹⁰. En las últimas mutaciones técnicas se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para actividad biológica (por ejemplo actividad de xilanasas) para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción enzima-sustrato también pueden ser determinados por análisis de estructura de cristal

35

como se determina por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcación de fotoafinidad^{11,12,13} o modelado molecular.

5 El uso de células huésped de levaduras y hongos se espera que proporcionen para tales modificaciones post-transcripcionales (por ejemplo elaboración proteolítica, miristilación, glicosilación, truncación, y fosforilación de la tirosina, serina o treonina) como se puede necesitar para conferir actividad biológica óptima en productos de expresión recombinante de la invención.

10 Los polipéptidos de la invención se pueden proporcionar en una forma tal que están fuera de su ambiente celular natural. Por lo tanto, pueden ser sustancialmente aislados o purificados, como se discute anteriormente, o en una célula en la cual se sitúan las que no ocurren naturalmente, por ejemplo una célula de otras especies de hongos, animales, levaduras o bacterias.

C. Aspectos Recombinantes.

15 La invención también provee vectores que comprenden un polinucleótido de la invención, incluyendo los vectores de clonación y de expresión, y métodos de crecimiento, transformación o transfección de tales vectores en una célula huésped apropiada, por ejemplo bajo condiciones en las cuales la expresión de un polipéptido de la invención ocurre. Se proveen también las células huéspedes que comprenden un polinucleótido o vector de la invención en donde el polinucleótido es heterólogo para el genoma de la célula huésped. El término "heterólogo", por lo general con respecto a la célula huésped, significa que el polinucleótido no ocurre naturalmente en el genoma de la célula huésped o que el polipéptido no se produce naturalmente por esa célula. Preferiblemente, la célula huésped es una célula de levadura, por ejemplo una célula de levadura del género *Kluyveromyces* o *Saccharomyces* o una célula de hongos, por ejemplo del género *Aspergillus*.

20 Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar en un vector replicable recombinante, por ejemplo un vector de clonación o de expresión. El vector se puede utilizar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por lo tanto, en otra modalidad, la invención provee un método de fabricación de polinucleótidos de la invención, mediante la introducción de un polinucleótido de la invención en un vector replicable, la introducción del vector en una célula huésped compatible, y cultivo de la célula huésped bajo condiciones que provocan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula huésped. Las células huéspedes apropiadas, se describen a continuación en conexión con los vectores de expresión.

Vectores

30 El polinucleótido de la invención puede insertarse en un casete de expresión. El vector en el cual el casete de expresión o polinucleótido de la invención se inserta, puede ser cualquier vector que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped en la cual esta se introduce. Por lo tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, i.e. un vector que existe como una entidad extra-cromosomal, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosomal, por ejemplo un plásmido. De manera alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el o los cromosomas, en los cuales este se ha integrado.

35 Preferiblemente, un polinucleótido de la invención en un vector se liga operativamente a una secuencia reguladora que es capaz de proveer la expresión de la secuencia codificante mediante la célula huésped, i.e. el vector es un vector de expresión. El término "ligado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia reguladora tal como un promotor, potenciador u otra señal de regulación de la expresión "ligada operativamente" a una secuencia codificante se coloca de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo una condición compatible con las secuencias control o las secuencias se disponen de manera que funcionen en coordinación para sus fines previstos, por ejemplo la transcripción inicia en un promotor y continua a través de la secuencia de ADN codificante para un polipéptido.

40 El vector puede ser un vector plasmídico, cósmico, virus o fago, por lo general provisto con un origen de replicación, opcionalmente un promotor de la expresión del polinucleótido y opcionalmente un potenciador y/o un regulador del promotor. Una secuencia terminadora puede estar presente, como puede ser una secuencia de poliadenilación. El vector puede contener uno o más genes marcadores genéticos, por ejemplo un gen de resistencia a la ampicilina (en el caso de un plásmido de bacteria) o un gen de resistencia a la neomicina (para un vector de mamífero). Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizar para transfectar o transformar una célula huésped. Pueden comprender dos o más polinucleótidos de la invención, por ejemplo para la sobreexpresión.

La secuencia de ADN codificante para un polipéptido preferiblemente se introduce en un huésped apropiado como parte de un casete de expresión (o construcción) en el cual la secuencia de ADN se liga operativamente a las señales de expresión que son capaces de dirigir la expresión de la secuencia de ADN en las células huéspedes. Para la transformación del huésped apropiado con los procedimientos de transformación de la construcción de la expresión son disponibles, que son bien conocidos por un experto^{3,4}. La construcción de expresión se puede utilizar para la transformación del huésped como parte de un vector que lleva un marcador genético, o la construcción de expresión puede ser co-transformada como una molécula separada junto con el vector que lleva un marcador genético. El vector puede comprender uno o más genes marcadores genéticos.

Los marcadores genéticos preferidos^{15,16} incluyen pero no se limitan a aquellos que complementan un defecto en la célula huésped o confieren resistencia a un fármaco. Incluyen por ejemplo genes marcadores versátiles que se pueden utilizar para la transformación de la mayoría de hongos filamentosos y levaduras tales como genes de acetamidasa o ADNcs (los genes *amdS*, *niaD*, *facA* o ADNcs de *A.nidulans*, *A.oryzae*, o *A.niger*), o genes que proveen resistencia a los antibióticos como G418, higromicina, bleomicina, kanamicina, fleomicina o resistencia al benomilo (*benA*). De manera alternativa, se pueden utilizar marcadores de selección específica tales como marcadores auxotróficos que necesitan las cepas de huéspedes mutantes correspondientes: por ejemplo *URA3* (de *S. cerevisiae* o genes análogos de otras levaduras), *pyrG* o *pyrA* (de *A.nidulans* o *A. niger*), *argB* (de *A.nidulans* o *A.niger*) o *trpC*. En una modalidad preferida el marcador de selección se suprime de la célula huésped transformada después de la introducción de la construcción de expresión con el fin de obtener las células huéspedes transformadas capaces de producir el polipéptido que está libre de genes del marcador de selección^{21,22}.

Otros marcadores incluyen ATP sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), orotidina-5'-fosfato Descarboxilasa (*pvrA*), el gen de resistencia G418 a la bacteria (este también se puede utilizar en la levadura, pero no en hongos), el gen de resistencia a la ampicilina (*E. coli*), el gen de resistencia a la neomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA E. coli*, codificante para β -glucuronidasa (GUS). Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizar para transfectar o transformar una célula huésped.

Para la mayoría de hongos filamentosos y levaduras, el vector o construcción de expresión preferiblemente se integra en el genoma de la célula huésped con el fin de obtener transformantes estables. Sin embargo, para ciertas levaduras también vectores episomales apropiados son disponibles en los cuales la construcción de expresión se puede incorporar para el nivel de expresión estable y alto, ejemplos de esto incluyen vectores derivados de los plásmidos 2 μ y pKD1 de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, respectivamente, o vectores que contienen una secuencia AMA (por ejemplo AMA1 del *Aspergillus*^{3,20}). En el caso de que las construcciones de expresión se integren en el genoma de las células huéspedes, las construcciones se integran, ya sea en el locus aleatorio en el genoma, o en el locus diana predeterminado utilizando recombinación homóloga, en cuyo caso el locus diana preferiblemente comprende un gen altamente expresado. Un gen altamente expresado es un gen cuyo ARNm puede representar al menos 0.01% (peso/peso) del ARNm celular total, por ejemplo bajo condiciones inducidas, o alternativamente, un gen cuyo producto génico puede representar al menos 0.2% (peso/peso) de la proteína celular total, o, en caso de un producto génico secretado, puede ser secretado a un nivel de al menos 0.05g/l. Un número de ejemplos de los genes altamente expresados apropiados se proveen a continuación.

Un vector o construcción de expresión para una célula huésped dada puede comprender los siguientes elementos ligados operativamente entre sí, en un orden consecutivo del extremo 5' al extremo 3' relativos a la cadena codificante de la secuencia codificante para un polipéptido de la primera invención:

(1) una secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de ADN codificante para un polipéptido en la célula huésped dada;

(2) opcionalmente, una secuencia señal capaz de dirigir la secreción del polipéptido de la célula huésped dada en un medio de cultivo;

(3) una secuencia de ADN codificante para una forma madura y preferiblemente activa del polipéptido; y preferiblemente también

(4) una región de terminación de la transcripción (terminadora) capaz de terminar la transcripción en dirección 3' de la secuencia de ADN codificante para un polipéptido.

En dirección 3' de la secuencia de ADN codificante para un polipéptido puede haber una región 3' sin traducir que contiene uno o más sitios de terminación de la transcripción (por ejemplo una terminadora). El origen de la terminadora es menos crítico. La terminadora por ejemplo puede ser nativa con la secuencia de ADN codificante para un polipéptido. Sin embargo, preferiblemente una levadura terminadora se utiliza en células huéspedes de levadura y una terminadora de hongo filamentososo se utiliza en células huéspedes de hongo filamentososo. Más preferiblemente, la terminadora es endógena a la célula huésped (en la cual la secuencia de ADN codificante para un polipéptido es para ser expresada).

La expresión potenciada del polinucleótido codificante para un polipéptido de la invención también se puede lograr mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo regiones promotoras, líder de secreción y/o terminadora, que pueden servir para incrementar la expresión y, si se desea, los niveles de secreción de la proteína de interés del huésped expresión y/o para proveer el control inducible de la expresión del polipéptido de la invención.

5 A parte del promotor nativo para el gen codificante para un polipéptido de la invención, otros promotores se pueden utilizar para dirigir la expresión del polipéptido de la invención. El promotor se puede seleccionar por su eficiencia en detectar la expresión del polipéptido de la invención en el huésped de expresión deseado.

10 Los promotores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión se pueden seleccionar para ser compatibles con la célula huésped, para lo cual el vector de expresión se diseña. Por ejemplo, se pueden utilizar los promotores procariotas, en particular aquellos apropiados para utilizar en cepas *E. coli*. Cuando la expresión se realiza en células de mamífero, se pueden utilizar promotores de mamífero. Los promotores específicos del tejido, por ejemplo promotores específicos de células hepatocito, también se pueden utilizar. Los promotores virales también se pueden utilizar, por ejemplo promotor del virus de la repetición terminal larga de la leucemia murina de Moloney (MMLV LTR), promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV), promotor SV40 (por ejemplo antígeno T grande), promotor IE del citomegalovirus humano (CMV), promotores del virus del herpes simplex o promotores de adenovirus, promotores HSV tales como los promotores IE HSV, o promotores HPV, particularmente la HPV región reguladora en dirección 5' (URR). Los promotores de levaduras incluyen promotores GAL4 y ADH de *S. cerevisiae*, el promotor de *S. pombe nmt 1* y *adh*. Los promotores de mamífero incluyen el promotor de metalotioneína que se puede inducir en respuesta a metales pesados tales como promotores de cadmio y β -actina. Los promotores específicos de tejido, en particular los promotores específicos de célula endotelial o neuronal (por ejemplo los promotores DDAH1 y DDAHII), son especialmente preferidos.

25 Una variedad de promoters^{15,16} se pueden utilizar que sean capaces de dirigir la transcripción en las células huéspedes de la invención. Preferiblemente la secuencia promotora se deriva de un gen altamente expresado como se definió previamente. Ejemplos de genes altamente expresados preferidos de los cuales los promotores se derivan preferiblemente y/o que están comprendidos en locus diana predeterminado preferido para la integración de construcciones de expresión, incluyen pero no se limitan a genes que codifican enzimas glicolíticas tales como isomerasas triosa-fosfato (TPI), deshidrogenasas gliceraldehído-fosfato (GAPDH), fosfo-glicerato quinasa (PGK), piruvato quinasa (PYK o PKI), alcohol deshidrogenasas (ADH), así como genes codificante para una amilasas, glucoamilasas, proteasas, xilanasas, celobiohidrolasas, β -galactosidasas, alcohol (metanol) oxidasas, factores de elongación y proteínas ribosomal. Ejemplos específicos de genes altamente expresados apropiados incluyen por ejemplo el gen LAC4 de *Kluyveromyces* sp., los genes de metanol oxidasa (AOX y MOX) de *Hansenula* y *Pichia*, respectivamente, los genes de glucoamilasa (*glA*) de *A. niger* y *A. awamori*, el gen TAKA-amilasa de *A. oryzae*, el gen de *gpdA* de *A. nidulans* y los genes de celubiohidrolasa de *T. reesei*.

35 Ejemplos de promotores constitutivos y/o inducibles fuertes que son preferidos para su uso en huéspedes de expresión de hongos^{15,16,35} son aquellos que se obtienen de los genes de hongos para xilanasas (*xlnA*), fitasa, ATP-sintetasa, la subunidad 9 (oliC), la triosa fosfato isomerasa (*tpi*), alcohol deshidrogenasa (*AdhA*), α -amilasa (*amy*), amiloglucosidasa (AG -del gen *glA*), acetamidasa (*amdS*) y los promotores de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*).

40 Ejemplos de promotores de levadura fuerte son aquellas obtenidas de los genes de alcohol deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato quinasa y triosefosfato isomerasa.

Ejemplos de promotores de bacterias fuertes son promotores de SPo2 y la α -amilasa así como los promotores de genes de proteasa extracelular.

El promotor del gen nativo codificante para una xilanasas se puede reemplazar por un promotor que se regula de manera diferente que el promotor nativo.

45 Los promotores apropiados para células vegetales incluyen promotores de napalina sintasa (*nos*), octopina sintasa (*ocs*), manopina sintasa (*mas*), subunidad pequeña de la ribulosa (*rubisco ssu*), histona, actina de arroz, faseolina, virus del mosaico del coliflor (CMV) 35S y 19S y circovirus. Todos estos promotores están fácilmente disponibles en la técnica.

50 El vector además puede incluir las secuencias que flanquean el polinucleótido dando origen al ARN que comprende secuencias homólogas a las secuencias genómicas eucariotas, preferiblemente secuencias genómicas de mamífero, o secuencias genómicas virales. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención en el genoma de las células eucarióticas o los virus por recombinación homóloga. En particular, un vector plasmídico que comprende el casete de expresión flanqueado por las secuencias virales, se puede utilizar para preparar un vector viral apropiado para el suministro de los polinucleótidos de la invención a una célula de mamífero. Otros ejemplos de vectores virales apropiados incluyen vectores virales del herpes simplex^{18,19} y los retrovirus, incluyendo lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus HPV (tales como HPV-16 o HPV-18). Las técnicas de transferencia del

gen que utilizan estos virus se conocen por aquellos expertos en la técnica. Los vectores de retrovirus por ejemplo se pueden utilizar para integrar establemente el polinucleótido dando origen al ARN antisentido en el genoma huésped. Los vectores de adenovirus defectuosos de replicación por el contrario permanecen episomales y permiten por lo tanto la expresión transitoria.

- 5 El vector puede contener un polinucleótido de la invención orientado en una dirección antisentido para proveer la producción de ARN antisentido. Este se puede utilizar para reducir, si se desea, los niveles de expresión del polipéptido.

Células huéspedes y Expresión

10 En otro aspecto la invención provee un proceso para preparar un polipéptido de acuerdo con la invención que comprende el cultivo de una célula huésped (por ejemplo transformada o transfectada con un vector de expresión como se describe anteriormente) bajo condiciones para proveer la expresión (mediante el vector) de una secuencia codificante para un polipéptido, y opcionalmente recuperando el polipéptido expresado. Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar en un vector replicable recombinante, por ejemplo un vector de expresión. El vector se puede utilizar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Por lo tanto en otra modalidad, la invención provee un método para elaborar un polinucleótido de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, la introducción del vector en una célula huésped compatible, y el cultivo de la célula huésped bajo condiciones que provocan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula huésped. Las células huéspedes apropiadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura, líneas celulares de mamífero y otras líneas celulares eucarióticas, por ejemplo células de insecto tales como células Sf9 y células de hongos (por ejemplo filamentosos).

25 Preferiblemente el polipéptido se produce como una proteína secretada en cuyo caso la secuencia de ADN codificante para una forma madura del polipéptido en la construcción de expresión se liga operativamente a una secuencia de ADN codificante para una secuencia señal. Preferiblemente la secuencia señal es nativa (homóloga) con la secuencia de ADN codificante para un polipéptido. De manera alternativa la secuencia señal es extraña (heteróloga) con la secuencia de ADN codificante para un polipéptido, en cuyo caso la secuencia señal preferiblemente es endógena a la célula huésped en la cual la secuencia de ADN se expresa. Ejemplos de secuencias de señal apropiadas para las células huéspedes de levadura son las secuencias de señal derivadas de genes del factor α de levadura. De manera similar, una secuencia señal apropiada para células huéspedes de hongo filamentoso es por ejemplo una secuencia señal derivada de un gen de amiloglucosidasa del hongo filamentoso (AG), por ejemplo el gen *glaA* de *A.niger*. Esto se puede utilizar en combinación con el mismo promotor de amiloglucosidasa (también denominada (gluco)amilasa), así como en combinación con otros promotores. Las secuencias de señal híbridas también se pueden utilizar en el contexto de la presente invención.

35 Las secuencias líderes de secreción heteróloga preferidas, son aquellas que se originan del gen de amiloglucosidasa (AG) de hongos (*glaA* – tanto las versiones de 18 y 24 aminoácidos por ejemplo del *Aspergillus*), el gen del factor α (levaduras por ejemplo *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o el gen α -amilasa (*Bacillus*).

Los vectores se pueden transformar o transfectar en una célula huésped apropiada como se describe anteriormente para proveer la expresión de un polipéptido de la invención. Este proceso puede comprender el cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión como se describe anteriormente bajo condiciones para proveer la expresión, mediante el vector de una secuencia codificante que codifica para un polipéptido.

40 Otro aspecto de la invención provee así las células huéspedes transformadas o transfectadas con o que comprende un polinucleótido o vector de la invención. Preferiblemente el polinucleótido se lleva en un vector para la replicación y expresión del polinucleótido. Las células se escogerán para ser compatibles con dicho vector y por ejemplo pueden ser células procariotas (por ejemplo bacterias), hongos, levaduras o vegetales.

45 Un huésped heterólogo también se puede escoger en donde el polipéptido de la invención se produce en una forma que sea sustancialmente libre de otras enzimas degradantes de la celulosa. Esto se puede lograr al escoger un huésped que normalmente no produzca dichas enzimas tales como *Kluyveromyces lactis*.

50 La invención abarca los procesos para la producción del polipéptido de la invención por medio de expresión recombinante de una secuencia de ADN codificante para un polipéptido. Para este propósito la secuencia de ADN de la invención se puede utilizar para la amplificación del gen y/o el intercambio de las señales de expresión, tales como promotores, secuencias de señal de secreción, con el fin de permitir la producción económica del polipéptido en una célula huésped homóloga o heteróloga apropiada. Una célula huésped homóloga es una célula huésped que es de las mismas especies o que es una variante dentro de las mismas especies como las especies de las cuales se deriva la secuencia de ADN.

Las células huéspedes apropiadas preferiblemente son microorganismos procariotas tales como bacterias, o más preferiblemente organismos eucarióticos, por ejemplo hongos, tales como levaduras o hongos filamentosos, o células vegetales. En general, las células de levadura se prefieren sobre las células de hongos porque ellas son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son pobremente secretadas de levaduras, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo hiperglicosilación en levadura). En estos casos, se debe seleccionar un organismo huésped fungoso.

La célula huésped puede sobre-exresar el polipéptido, y las técnicas de ingeniería de sobre-expresión son bien conocidas³. El huésped por lo tanto, puede tener dos o más copias del codificante para un polinucleótido (y el vector por lo tanto, puede tener dos o más copias respectivamente).

Las bacterias del género *Bacillus* son muy apropiadas como huéspedes heterólogos debido a su capacidad para secretar las proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias apropiadas como huéspedes son aquellas del género *Streptomyces* y *Pseudomonas*. Una célula huésped de levadura preferida para la expresión de la secuencia de ADN codificante para un polipéptido es del género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Yarrowia*, y *Schizosaccharomyces*. Más preferiblemente una célula huésped de levadura se selecciona del grupo que consiste de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (también conocida como *Kluyveromyces marxianus var. lactis*), *Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*, *Yarrowia lipolytica*, y *Schizosaccharomyces pombe*.

Sin embargo, las más preferidas son las células huéspedes de hongos (por ejemplo filamentosos). Las células huéspedes de hongo filamentoso preferidas se seleccionan del grupo que consiste del género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Neurospora*, *Thermoascus*, *Myceliophthora*, *Sporotrichum*, *Thielavia*, y *Talaromyces*. Más preferiblemente una célula huésped de hongo filamentoso es de la especie *Aspergillus ozyae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus nidulans*, o una especie del Grupo *Aspergillus niger*²³. Estas incluyen pero no se limitan a *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonicas*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus ficuum*, y además consisten de la especie *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium alabamense*, *Neurospora crassa*, *Myceliophthora thermophilum*, *Sporotrichum cellulophilum*, *Disporotrichum dimorphosporum* y *Thielavia terrestris*. Ejemplos de huéspedes de expresión preferidos dentro del alcance de la presente invención son hongos tales como la especie *Aspergillus*^{24,25} y especie *Trichoderma*; bacterias tales como especie *Bacillus*^{26,27}, por ejemplo especies *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pseudomonas*; y levaduras tales como especie *Kluyveromyces*²⁸, por ejemplo *Kluyveromyces lactis*²⁹ y especie *Saccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*.

Las células huéspedes de acuerdo con la invención incluyen células vegetales, y la invención por lo tanto se extiende a organismos transgénicos, tales como plantas y partes de estas, que contienen una o más células de la invención. Las células pueden expresar heterológamente el polipéptido de la invención o puede contener heterológamente uno o más de los polinucleótidos de la invención. La planta transgénica (o modificada genéticamente) por lo tanto, puede tener insertada (por ejemplo establemente) en su genoma una secuencia codificante para uno o más de los polipéptidos de la invención. La transformación de células vegetales se puede realizar utilizando técnicas conocidas, por ejemplo utilizando un plásmido Ti o un Ri del *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido (o vector) puede contener así secuencias necesarias para infectar una planta, y se pueden emplear los derivados de los plásmidos Ti y/o Ri.

De manera alternativa, la infección directa de una parte de una planta, tal como una hoja, raíz o tallo se puede realizar. En esta técnica la planta a ser infectada se puede herir, por ejemplo mediante el corte de la planta con una maquinilla de afeitar o punzar la planta con una aguja o friccionar la planta con un abrasivo. La herida luego se inocula con el *Agrobacterium*. La planta o parte de la planta luego se puede cultivar en un medio de cultivo apropiado y se le permite desarrollarse hasta una planta madura. La regeneración de células transformadas en plantas genéticamente modificadas se puede lograr utilizando técnicas conocidas, por ejemplo mediante la selección de brotes transformados utilizando un antibiótico y mediante el sub-cultivo de los brotes en un medio que contiene los nutrientes apropiados, las hormonas de plantas y similares.¹⁷

Cultivo de células huéspedes y producción recombinante

La invención también incluye células que han sido modificadas para expresar la xilanaso o una variante de esta. Tales células incluyen líneas celulares eucarióticas superiores, transitorias o preferiblemente estables, tales como células de mamífero o células de insecto, células eucarióticas inferiores, tales como levadura y (por ejemplo filamentosos) células de hongos o células procarióticas tales como células bacterianas.

También es posible para las proteínas de la invención que se expresen transitoriamente en una línea celular o en una membrana, tal como por ejemplo en un sistema de expresión del baculovirus. Tales sistemas, que se adaptan para expresar las proteínas de acuerdo con la invención, también se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, la producción del polipéptido de la invención se puede realizar mediante el cultivo de huéspedes de expresión microbiana, que han sido transformados con uno o más polinucleótidos de la presente invención, en un medio de fermentación del nutriente convencional.

5 Las células huéspedes recombinantes de acuerdo con la invención se pueden cultivar utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Para cada combinación de un promotor y una célula huésped, la condición del cultivo que está disponible conduce a la expresión de la secuencia de ADN codificante para un polipéptido. Después de alcanzar la densidad o título celular deseado del polipéptido, el cultivo se detiene y el polipéptido se recupera utilizando procedimientos conocidos.

10 El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contiene una fuente de carbón (por ejemplo glucosa, maltosa, molasas, etc.), una fuente de nitrógeno (por ejemplo sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc.), una fuente de nitrógeno orgánico (por ejemplo extracto de levadura, extracto de malta, peptona, etc.) y fuentes de nutrientes inorgánicos (por ejemplo fosfato, magnesio, potasio, zinc, hierro, etc.). Opcionalmente, se puede incluir un inductor (por ejemplo celulosa, pectina, maltosa, maltodextrina o xilogalacturonano).

15 La selección del medio apropiado se puede basar en la elección de huésped de expresión y/o basándose en los requisitos regulatorios de la construcción de expresión. Tales medios se conocen por aquellos expertos en la técnica. El medio puede, si se desea, contener componentes adicionales que favorecen los huéspedes de expresión transformados sobre otros microorganismos potencialmente contaminantes.

20 La fermentación se puede realizar durante un periodo de 0.5-30 días. Esta puede ser un proceso en lote, continuo o alimentado en lotes, adecuadamente a una temperatura en el rango de entre 0 y 45°C y, por ejemplo, a un pH entre 2 y 10. Las condiciones de fermentación preferidas son una temperatura en el rango de entre 20 y 37°C y/o un pH entre 3 y 9. Las condiciones apropiadas, por lo general se seleccionan basándose en la elección del huésped de expresión y la proteína a ser expresada.

25 Después de la fermentación, si es necesario, las células se pueden remover del caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Después de que la fermentación se ha detenido o después de la remoción de las células, luego el polipéptido de la invención se puede recuperar y, si se desea, purificar y aislar por medios convencionales.

D. Usos de la xilanasa y métodos para procesar la planta o los materiales que contienen celulosa (por ejemplo xilano)

30 Los polipéptidos de la invención que poseen actividad de xilanasa se pueden utilizar para tratar material de hongos o vegetal incluyendo pulpa vegetal y extractos de plantas. Por ejemplo, se pueden utilizar para tratar cereales, vegetales, frutas o extractos de estas. Convenientemente el polipéptido de la invención se combina con portadores (sólido o líquido) o diluentes apropiados, incluyendo soluciones reguladoras para producir una preparación de la composición/enzima. El polipéptido se puede unir a o mezclar con un portador, por ejemplo inmovilizado sobre un portador sólido. Por lo tanto, la presente invención provee en otro aspecto una composición que comprende un polipéptido de la invención. Esta puede estar en una forma apropiada para empaque, transporte y/o almacenamiento, preferiblemente donde se retiene la actividad de xilanasa. Las composiciones pueden ser de masa, líquido, emulsión, polvo, hojuelas, gránulos, pellets u otras formas de extruidos.

35 La composición además puede comprender ingredientes adicionales tales como una o más enzimas, por ejemplo pectinasas, incluyendo endo-arabinanasa y ramnogalacturonasa, celulasas, (otras) xilanasas, galacturonasas, mananasas y/o xiloglucanasas. El polipéptido, por lo general se formula establemente ya sea en forma líquida o seca. Por lo general, el producto se hace como una composición que opcionalmente incluirá, por ejemplo, una solución reguladora estabilizante y/o conservante. Las composiciones también pueden incluir otras enzimas capaces de digerir material vegetal o celulosa, por ejemplo otras celulasas, por ejemplo (β -D-)glucanasas. Para ciertas aplicaciones, se puede preferir la inmovilización de la enzima sobre una matriz sólida o la incorporación sobre o en partículas portadoras sólidas. La composición también puede incluir una variedad de otras enzimas degradantes de material vegetal, por ejemplo celulasas y otras pectinasas.

40 Los polipéptidos y composiciones de la invención por lo tanto se pueden utilizar en un método de procesar material vegetal para degradar o modificar los constituyentes de la celulosa (por ejemplo xilano) de las paredes celulares del material de hongos o vegetal. Por lo tanto en otro aspecto, la presente invención provee un método de la degradación o modificación de una célula vegetal, método que comprende poner en contacto la planta o célula de hongos con un polipéptido o composición de la invención.

45 La invención también provee un método de procesar un material vegetal, método que comprende poner en contacto el material vegetal con un polipéptido o composición de la invención para degradar o modificar la celulosa en el material (vegetal). Preferiblemente el material vegetal es una pulpa de la planta o extracto de planta, tal como jugos.

En particular, la degradación preferiblemente comprende la escisión de subunidades de xilano de un componente de celulosa de la pared de la célula vegetal. El material vegetal preferiblemente es un cereal, vegetal, fruta o vegetal o pulpa o extracto de fruta. La presente invención además provee un material vegetal procesado que se obtiene poniendo en contacto un material vegetal con un polipéptido o composición de la invención.

- 5 La presente invención también provee un método para reducir la viscosidad de un extracto de planta, método que comprende poner en contacto el extracto de planta con un polipéptido o composición de la invención en una cantidad efectiva para degradar la celulosa (o xilano) contenida en el extracto de planta.

10 La planta y los materiales que contienen celulosa incluyen pulpa vegetal, partes de planta y extractos de plantas. En el contexto de esta invención un extracto de un material vegetal es cualquier sustancia que se puede derivar del material vegetal mediante la extracción (mecánica y/o química), procesado o por otras técnicas de separación. El extracto puede ser jugo, néctar, base, o concentrados hechos de estos. El material vegetal pueden comprender o ser derivado de vegetales, por ejemplo, zanahorias, apio, cebollas, legumbres o plantas leguminosas (soja, soja, alverjas) o frutas, por ejemplo, pomos o frutas de semillas (manzanas, peras, membrillo etc.), uvas, tomates, cítricos (naranja, limón, lima, mandarina), melones, ciruelas pasas, cerezas, grosellas negras, grosellas rojas, frambuesas, fresones, arándanos, piña y otras frutas tropicales, árboles y partes de este (por ejemplo polen, de árboles de pino), o cereales (avena, cebada, trigo, maíz, arroz). El material (a ser hidrolizado) también puede ser residuos agrícolas, tales como pulpa de remolacha azucarera, mazorcas de maíz, paja de trigo, cáscaras de nueces (molidas), o materiales reciclables, por ejemplo papel (residuos).

15 Los polipéptidos de la invención, por lo tanto se pueden utilizar para tratar material vegetal incluyendo pulpa vegetal y extracto de plantas. También pueden ser utilizados para tratar productos alimenticios líquidos o sólidos o ingredientes de productos alimenticios comestibles, o ser utilizados en la extracción de café, aceites vegetales, almidón o como espesante en alimentos.

20 Por lo general, los polipéptidos de la invención se utilizan como una preparación de composición/ enzima como se describe anteriormente. La composición generalmente será adicionada a la pulpa vegetal que se obtiene mediante, por ejemplo procesamiento mecánico tal como macerar o moler el material vegetal. La incubación de la composición con la planta por lo general será realizada durante un tiempo entre 10 minutos a 5 horas, tal como 30 minutos a 2 horas, preferiblemente durante aproximadamente 1 hora. La temperatura de procesamiento preferiblemente es 10-55°C, por ejemplo de 15 a 25°C, de manera óptima aproximadamente 20°C y se pueden utilizar de 10-300 g, preferiblemente de 30-70g, de manera óptima aproximadamente 50g de enzima por tonelada del material a ser tratado. Toda(s) la(s) enzima(s) o sus composiciones utilizadas se pueden adicionar secuencialmente o al mismo tiempo a la pulpa vegetal. Dependiendo de la composición de la preparación de la enzima del material vegetal primero se puede macerar (por ejemplo, a un puré) o licuificar. Utilizando los parámetros de procesamiento de los polipéptidos de la invención tales como el rendimiento de la extracción, viscosidad del extracto y/o la calidad del extracto se pueden mejorar. De manera alternativa, o en adición a lo anterior, un polipéptido de la invención se puede adicionar al jugo bruto obtenido de presionar o licuificar la pulpa vegetal. El tratamiento del jugo bruto se llevará a cabo de una manera similar a la pulpa vegetal con respecto a la dosificación, temperatura y tiempo de mantenimiento. De nuevo, se pueden incluir otras enzimas tales como aquellas que se discutieron previamente. Las condiciones de incubación típicas son como se describe en el párrafo previo. Una vez que el jugo bruto se ha incubado con los polipéptidos de la invención, el jugo luego se centrifuga o (ultra) filtra para producir el producto final.

25 Después del tratamiento con el polipéptido de la invención el producto (final) se puede tratar térmicamente, por ejemplo a 100°C durante un tiempo entre 1 minuto a 1 hora, bajo condiciones para inactivar parcial o completamente el o los polipéptidos de la invención.

30 Una composición que contiene un polipéptido de la invención también se puede utilizar durante la preparación de purés de frutas o vegetales.

35 El polipéptido de la invención también se puede utilizar en la elaboración de la cerveza, fabricación del vino, destilación u horneado. Por lo tanto puede ser utilizada en la preparación de bebidas alcohólicas tales como vino y cerveza. Por ejemplo puede mejorar la capacidad de filtración o la claridad (de cervezas, mosto o vino). La proteína puede ayudar en la eliminación de sustancias orgánicas disueltas del caldo o medio de cultivo, por ejemplo donde residuos de destilería a partir de origen orgánico se bioconvierte en biomasa microbiana. La xilanasasa puede mejorar la capacidad de filtración y/o reducir la viscosidad en jarabes de glucosa, tales como de cereales producidos por licuefacción (por ejemplo con α -amilasa).

40 En el horneado el polipéptido puede mejorar la estructura de la masa, modificar su pegajosidad o flexibilidad, mejorar el volumen del pan y/o la estructura de la miga o impartir mejores características de textura tales como rotura, trituración o calidad de la miga. El polipéptido se puede adicionar en una cantidad entre 100 a 3,000, tal como de 150 a 2,000, de manera óptima de 200 a 1,600, EXU/kg de harina.

Los polipéptidos encuentran uso en un número de áreas industriales debido a su actividad de xilanasas. Estos pueden incluir no solo producción de alcohol, pero también en biometanación, en la elaboración del pan y en horneado, en higiene dental (por ejemplo composiciones dentales u orales), en el tratamiento o manufactura de del cuero, en la fabricación del papel, en productos farmacéuticos, en té, en la preparación o tratamiento de textiles, y en el tratamiento de residuos. Un aspecto de la invención es por lo tanto un alimento o producto alimenticio que comprende el polipéptido, tal como una bebida alcohólica, pan, masa o té. El polipéptido se puede formular en composiciones apropiadas para cualquiera de estos usos. El polipéptido puede estar presente en una composición acuosa (por ejemplo, agua caliente), preferiblemente con uno o más fungicidas, con el fin de tratar material vegetal (por ejemplo, bulbos), especialmente para controlar insectos parásitos, garrapatas y nemátodos. Como los polipéptidos de la invención pueden degradar el xilano se pueden adicionar a alimentos o productos alimenticios (por ejemplo por el consumo de humanos). La invención también incluye composiciones farmacéuticas y veterinarias que comprenden el polipéptido de la invención y el portador farmacéutica o veterinariamente aceptable.

Los polipéptidos de la invención también pueden jugar una actividad anti-fúngica. Pueden ser capaces de degradar las paredes celulares de hongos, y por lo tanto se pueden emplear para la lisis de la pared celular de hongos, con el fin de abrir las células. Esto puede liberar las proteínas intracelulares. De esta manera los polipéptidos se pueden utilizar para preparar extractos de levaduras y/o hongos.

E. Piensos para Animales

La invención adicionalmente se relaciona con productos alimenticios o una composición o aditivo de pienso para animal que comprende uno o más polipéptidos de la invención. El polipéptido puede estar presente en el pienso a una concentración diferente de su concentración natural. Las cantidades preferidas están entre 0.6 a 35, tal como de 1.5 a 15, preferiblemente de 3 a 15, mg por kg de pienso. En consecuencia el polipéptido de la invención está presente en el pienso de entre 1,000 a 50,000 EXU/kg de pienso, tal como de 2,500 a 25,000 EXU/kg, de manera óptima de 5,000 a 20,000 EXU/kg.

La invención también se relaciona con un proceso para la preparación de una composición de pienso para animal, el proceso que comprende la adición a una o más sustancia(s) o ingrediente(s) de pienso comestible, adecuadamente que contiene xilano, un polipéptido de la invención. Los polipéptidos se pueden adicionar a la composición de pienso para animal de forma separada de las sustancias o ingrediente del pienso, individualmente o en combinación con otros aditivos de piensos. El polipéptido puede ser una parte integral de una de las sustancias o ingredientes del pienso.

Los polipéptidos de la invención también se pueden adicionar a los piensos para animales ricos en celulosa para mejorar la descomposición de la pared de la célula vegetal que conduce al uso mejorado de los nutrientes de la planta por el animal. Los polipéptidos de la invención se pueden adicionar al pienso o ensilaje si se prefiere que se pre-embeban o las dietas húmedas. Ventajosamente, los polipéptidos de la invención pueden continuar degradando la celulosa en el pienso *in vivo*. Los polipéptidos de la invención basados en hongos en particular generalmente tienen un pH inferior óptimo y son capaces de liberar nutrientes importantes en tales ambientes ácidos como el estómago de un animal. La invención por lo tanto también contempla piensos o productos alimenticios (por ejemplo, animales) que comprenden uno o más polipéptidos de la invención.

Los polipéptidos de la invención también se pueden utilizar durante la producción de sustituyentes de leche (o reemplazadores) de la soja. Estos sustituyentes de leche se pueden consumir tanto por humanos como animales. Un problema típico durante la preparación de estos sustituyentes de leche es la alta viscosidad de la suspensión de soja, que resulta en la necesidad de una dilución no deseada de la suspensión a una concentración de sólidos secos del 10 a 15%. Una preparación de enzima que contiene un polipéptido de la invención se puede adicionar a, o durante el procesamiento de, la suspensión, permitiendo el procesamiento a una concentración superior (por lo general 40 a 50%) de sólidos secos. La enzima también se puede utilizar en la preparación de producto(s) sabroso(s), por ejemplo de la soja.

La composición adicionalmente puede comprender (particularmente cuando se formula para uso en pienso para animal) uno o más ionóferos, agentes de oxidación, agentes tensoactivos, aminoácidos protegidos del rumen, enzima potenciadoras o enzimas que se pueden producir naturalmente en el tracto gastro-intestinal de los animales a ser alimentados.

Cuando se adicionan a los piensos (incluyendo el ensilaje) para los rumiantes o animales mono-gástricos (por ejemplo pollos o cerdos) los piensos pueden comprender cereales tales como cebada, trigo, maíz, arroz o avena o sub-productos de cereales tales como salvado de trigo o salvado de maíz, u otros materiales vegetales tales como soja y otras leguminosas. La(s) enzima(s) puede(n) mejorar significativamente la descomposición de paredes de las células vegetales que conducen a un mejor uso de los nutrientes de la planta por el animal. Como consecuencia, la tasa de crecimiento y/o conversión del pienso se pueden mejorar. Los polipéptidos de la invención se pueden adicionar al pienso (directamente o como un aditivo o ingrediente) o se puede adicionar en su lugar un ingrediente de pienso tratado (por ejemplo celulosa /xilano).

La proteína puede reducir la viscosidad del pienso (que contiene xilano): la proteína pueden continuar hidrolizando el xilano *in vivo*. La proteínas de la invención particularmente son aplicables a piensos para animales, ya que ellas pueden ser activas bajo condiciones altamente ácidas, tal como en el estómago de animales.

5 Un método particularmente preferido para la adición (exógena) de la xilanasa modificada es adicionar el polipéptido de la invención como material vegetal transgénico y/o semilla (por ejemplo transgénica). El polipéptido por lo tanto, puede haber sido sintetizado a través de una expresión de gen heterólogo, por ejemplo el gen codificante para la enzima deseada puede ser clonado en un vector de expresión vegetal, bajo el control de las señales de expresión vegetal apropiadas, por ejemplo un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico de semilla. El vector de expresión que contiene el gen codificante para un polipéptido posteriormente puede ser transformado en 10 células vegetales, y células transformadas se puede seleccionar para la regeneración en las plantas completas. Por lo tanto las plantas transgénicas obtenidas se pueden cultivar y cosechar, y aquellas partes de las plantas que contienen el polipéptido heterólogo (en la planta) se pueden incluir en una de las composiciones, ya sea como tal o para un procesamiento posterior. Se conocen, los métodos generales para la expresión (heteróloga) de enzimas en plantas (transgénicas), incluyendo los métodos para la expresión de enzimas específicas de la semilla³⁰. El 15 polipéptido heterólogo puede estar contenido en la semilla de las plantas transgénicas o puede estar contenido en otra parte de las plantas tales como raíces, tallos, hojas, madera, flores, cortezas y/o fruta. La planta puede ser una monocotiledónea o una dicotiledónea. Las plantas apropiadas incluyen cereales, tales como avena, cebada, trigo, maíz y arroz. Preferiblemente el polinucleótido de la invención se incorpora establemente en el genoma de la planta.

20 La adición del polipéptido en la forma de material vegetal transgénico, por ejemplo en semilla transgénica puede requerir el procesamiento del material vegetal con el fin de hacer la enzima disponible, o al menos mejorar su disponibilidad. Tales técnicas de procesamiento pueden incluir varias técnicas de mecánica (por ejemplo molido y/o molienda) o tratamientos termodinámicos tales como extrusión o expansión.

25 Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con un proceso para promover el cultivo y/o la conversión del pienso en un animal mono-gástrico o no-rumiante, el proceso que comprende alimentar el polipéptido animal de la invención. Los animales apropiados incluyen animales de granja, monogástricos y/o no-rumiantes tales como cerdos (o lechones), aves de corral (tales como pollos, pavos), becerros o terneras o animales acuáticos (por ejemplo marinos) (por ejemplo peces).

Ensayos para Enzimas Degradantes de la Celulosa

30 También dentro de la presente invención está el uso de polipéptidos de acuerdo con la invención en métodos de selección para identificar los compuestos que pueden actuar como agonistas o antagonistas que pueden modular la xilanasa. En términos generales, tales métodos de selección pueden involucrar poner en contacto un polipéptido de la invención con un compuesto de prueba y luego la medición de la actividad o incubación de un polipéptido de la invención con una sustancia de prueba y luego la detección de cualquier modulación de la actividad de xilanasa. Los 35 agentes que se unen a los polipéptidos de la presente invención también se pueden identificar mediante ensayos de enlace.

La actividad moduladora se puede determinar poniendo en contacto las células que expresan un polipéptido de la invención con una sustancia bajo la investigación y mediante el monitoreo del efecto mediado por los polipéptidos. Las células que expresan el polipéptido puede ser *in vitro* y preferiblemente, el ensayo se realiza *in vitro* utilizando las células que expresan el polipéptido recombinante.

40 Los ensayos y sustratos descritos en este documento han permitido la identificación y confirmación de la actividad de xilanasa. Estos ensayos se pueden utilizar para detectar otras enzimas que degradan la celulosa, por ejemplo aquellos con actividad de xilanasa. El sustrato que se puede utilizar para este ensayo puede comprender xilano.

45 Otro aspecto de la invención se relaciona con un ensayo para identificar o detectar un polipéptido que es capaz de degradar la celulosa. La actividad puede ser una xilanasa, o, puede ser pectina liasa, poligalacturonasa, estearasa, celulasa, xiloglucanasa, galactonasa, arabinanasa o ramnogalacturonasa. El ensayo puede comprender:

(a) proporcionar, como un sustrato para un compuesto candidato (por lo general un polipéptido), un sustrato apropiado (como se describe);

y

50 (b) poner en contacto el sustrato con el compuesto candidato, y detectar si se produce cualquiera de los productos de actividad de xilanasa.

Los ensayos anteriores se pueden emplear para identificar los moduladores de la actividad de xilanasa. Tales compuestos pueden reducir la suavidad de fruta, lo que puede permitir mejor sabor y desarrollo de color de la fruta y

también puede permitir para una vida media y/o de almacenamiento más larga. Por lo tanto estos ensayos se pueden utilizar para identificar inhibidores de los polipéptidos de la invención que pueden ser capaces de inhibir la suavidad de la fruta.

5 Las características y rasgos preferidos de un aspecto de la invención son aplicables a otro aspecto *mutatis mutandis*.

La invención ahora será descrita con la referencia a los siguientes Ejemplos que tienen la intención de ser solamente ilustrativos y no limitantes.

EJEMPLOS

Procedimientos generales

10 Las técnicas de clonación molecular estándar tales como el aislamiento de ADN, electroforesis en gel, modificaciones de restricción enzimática de ácido nucleicos, el análisis Southern, la transformación *E. coli*, levantamientos de colonia e hibridaciones del filtro etc., se realizaron utilizando técnicas estándar^{1,2}. Los oligo desoxinucleótidos sintéticos fueron obtenidos de ISOGEN Bioscience (Maarssen, The Netherlands). La secuencia de análisis de ADN se realizaron en un secuenciador de ADN Applied Biosystems 373A, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 La marcación e hibridación del ADN se realizaron de acuerdo con la marcación y dirección del ácido nucleico directa ECL™ y con los sistemas de detección (Amersham LIFE SCIENCE, Little Chalfont, England) o de acuerdo con las técnicas de marcación radiactiva estándar¹.

EJEMPLO 1: aislamiento del ARN a partir de *T. emersonii* y síntesis de ADNc

20 La cepa *T. emersonii* CBS 393.64 se fermentó bajo las condiciones inductoras de xilano. En varios puntos de tiempo los sobrenadantes del micelio y cultivo se cultivaron por filtración utilizando un envoltorio de filtración Miracloth. El micelio se lavó extensivamente con agua desmineralizada y se exprimó entre toallas de papel para remover el exceso de agua. El micelio de puntos de tiempo seleccionados (basándose en las mediciones de celulasa en los sobrenadantes de cultivo) se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se molió a un polvo fino utilizando un mortero y macerador. El polvo resultante se transfirió a un tubo estéril de 50 ml y se pesó: para cada 1-1.2 g del micelio molido 10 ml reactivo TRIzol (Gibco/BRL) se adicionó (max. 25 ml por tubo). El polvo micelial se solubilizó inmediatamente mediante la mezcla vigorosa (con un vortex, 1 min), seguido por 5 minutos a temperatura ambiente de incubación con mezcla ocasional. Se adicionó un volumen de 0.2 (original TRIzol) de cloroformo (por lo tanto 2 ml para cada 10 ml de TRIzol utilizado originalmente), se sometió a vortex y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 4°C, 6000 g durante 30 minutos. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo fresco y se precipitó el ARN total mediante la adición de un volumen de 0.5 (TRIzol original) de alcohol isopropílico (por lo tanto 5 ml de alcohol isopropílico para cada 10 ml de TRIzol utilizado originalmente). Después de 10 minutos de precipitación a temperatura ambiente, el ARN se recuperó por centrifugación durante 30 minutos a 6000 g. En la eliminación del sobrenadante el pellet de ARN se enjuagó con un volumen de 70% de etanol. Después de la eliminación del etanol, el pellet de ARN se secó con aire. El pellet de ARN seco se disolvió en 3 ml de solución reguladora de GTS (Tris-Cl 100 mM, pH 7.5, tiocianato de guanidinio 4 M, 0.5 % de lauril sarcosinato de sodio). Se utilizaron 10 µl de solución de ARN para determinar la calidad y concentración de los ácidos nucleicos.

35 El análisis Northern se realizó³ y el ARN aislado además se purificó.^{1,3} Para el aislamiento de ARNm se utilizó un protocolo modificado (utilizando flujo de gravedad en lugar de centrifugación) del kit de purificación PHARMACIA (Cat no. 27-9258-02).³ Para la síntesis de ADNc se utilizó el Kit de Síntesis de ADNc STRATAGENE de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto por un número de optimizaciones para utilizar los vectores pGBFIN con mayores cambios como se ha descrito previamente.³

La cantidad de ADNc sintetizado se estimó por precipitación TCA y posteriormente se analizó vía electroforesis en geles de agarosa alcalina.³

45 EJEMPLO 2: Preparación de una biblioteca de ADNc de ARNm de *T. emersonii*

El grupo de ADNc obtenido en el Ejemplo 1 fue despuntado, se liga con los adaptadores y la enzima de restricción digerida.³

La clonación del ADNc en el vector de expresión pGBFIN-113 requiere la presencia de un sitio EcoRI en el extremo 5'- y de un sitio XhoI en el extremo 3' del ADNc. Por consiguiente, el primer oligonucleótido cebador de la cepa y las secuencias adaptadoras utilizadas (Pharmacia) se escogieron para cumplir los requisitos establecidos para el vector de expresión.

Los ADNcs obtenidos se separaron por vía de fraccionamiento de tamaño a través de una matriz de SEPHAROSE CL-2B, luego de lo cual el tamaño de los grupos individuales obtenidos se analizaron por vía electroforesis en gel no-desnaturalizante.³ Dos grupos de ADNcs, obtenidos mediante niveles de corte a 0.5 kb y 1.0 kb respectivamente, se seleccionaron para la construcción de la biblioteca de ADNc en pGBFIN- 11. Para el pGBFIN-11, se preparó un grupo de un vector pGBFIN-11 completamente digerido doble (EcoRI-XhoI) (de la ligación base < 1 %). Los grupos de ADNc seleccionados se ligaron en el vector pGBFIN-11 y se transformaron en células bacterianas de *E. coli* XL10-Gold para generar dos bibliotecas de ADNc primario. Las frecuencias de transformación de los dos grupos fueron ambas >1.0 x 10⁶.

De una fracción de ambas las bibliotecas de ADNc de *E. coli*, se seleccionaron las colonias aleatoriamente y se aisló el ADN del plásmido. El análisis de este ADN del plásmido demostró que ambas bibliotecas de ADNc tuvieron porcentajes de inserto entre 90 y 95%.

Adicionalmente, se realizaron los levantamientos de colonia de una fracción de la biblioteca y los filtros generados posteriormente se hibridaron con el gen *gpdA* de *T. emersonii*, codificante para un gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Luego, el ADN del plásmido se aisló y mediante el análisis de restricción se demostró que todo el plásmido contenía insertos simples en la orientación correcta. La secuenciación de los extremos 5' del ADNc dentro de estos plásmidos que contienen *gpdA* de *T. emersonii* demostró que > 85% fue de longitud completa.

EJEMPLO 3: Transformación de la biblioteca de expresión para *A. niger*

El ADN se aisló de la biblioteca de ADNc de *E. coli* como se describe anteriormente. El ADN del plásmido total fue digerido, durante 4 horas a 37°C con NotI para remover las secuencias del plásmido derivado de *E. coli*. Después de la purificación, el ADN se disolvió en agua desmineralizada estéril.

Las transformaciones múltiples de DS2978 de *A. niger* se realizaron³, utilizando 1.5 x 10⁷ a 3.0 x 10⁷ protoplastos y 10 µg del ADN del plásmido por transformación. Los transformantes se seleccionaron para la presencia del marcador de selección *amdS* mediante el cultivo sobre acetamida como un sola fuente de N. Dado que tanto el marcador de selección *amdS* y el casete de expresión de ADNc están presentes en el fragmento de integración cultivado sobre la acetamida es indicativo para la presencia de un casete de expresión de ADNc.

Después de aproximadamente 7-10 días de incubación a 30°C, se purificaron 10,000 transformantes: los transformantes de *Aspergillus niger* se transfirieron robóticamente (Flexys™ colony picker automater) de las placas de transformación hacia las Placas MTP Master de 96 pozos (MPs) que contienen 150 µl por pozo de medio selectivo solidificado (SM) (por 1000ml: 0.52 g de KCl, 1.52 g de K₂HPO₄, 0.52 g de MgSO₄, 20g de glucosa, 1g de acetamida, 0.1M de solución reguladora MES, 15g de agar, 1ml de solución de elementos trazas (que contiene, por litro: 2.2g de ZnSO₄/7H₂O, 1.1g de H₃BO₃, 0.5g de FeSO₄/7H₂O, 0.17g de CoCl₂/6H₂O, 0.16g de CuSO₄/5H₂O, 0.15g de NaMoO₄/2H₂O, 5.0g de EDTA, pH 6.5) pH 5.5. Los transformantes se cultivaron sobre SM durante 5 días a 34°C. El grupo así generado de MPs se utilizó para inocular MTPs para el crecimiento y posterior detección de enzima y placas de respaldo (BPs) de la biblioteca de ADNc que se almacenan a -80°C.

EJEMPLO 4: Análisis de la biblioteca de expresión de *T. emersonii*

Las MPs de 5 días-de edad cultivadas, se utilizaron como plantilla de replicación y las replicas se sembraron en placas sobre placas de medios selectivo fresco (SM), que contiene 0.075% de AZCL-xilano (que contiene por litro: 0.52 g de KCl, 1.52 g de K₂HPO₄, 0.52 g de MgSO₄, 20g de glucosa, 1g de acetamida, solución reguladora MES 0.1M, 15g de agar, 1ml de solución de elementos trazas (por 1 litro: 2.2g de ZnSO₄/7H₂O, 1.1g de H₃BO₃, 0.5g de FeSO₄/7H₂O, 0.17g de CoCl₂/6H₂O, 0.16g de CuSO₄/5H₂O, 0.15g de NaMoO₄/2H₂O, 5.0g de EDTA, pH 6.5) pH 5.5, 0.75g de AZCL-xilano (Megazyme, Australia).

Una vez inoculadas las placas se incubaron a 34°C, durante 48 horas y luego durante 6 horas a 65°C. Las placas se valoraron antes y después de la incubación a alta temperatura. Las colonias positivas que presentan una actividad de xilanas mostraron un halo difuso de color azul.

Los clones de xilanas positivos de esta primera selección se inocularon de nuevo sobre un medio SM fresco y se cultivan durante 5 días a 34°C. A continuación, la placa de la plantilla así obtenida a continuación se replicó sobre medio selectivo y sobre medio selectivo que contiene 0.075% (peso/v) de AZCL-xilano (Megazyme). La placa de AZCL-xilano se trató como se describe previamente.

Las placas SM se incubaron durante 48 horas a 34°C y posteriormente se llenaron con un xilano de avena espelta que contiene top-agar (5g de agarosa, 0.5g de xilano de avena espelta (Sigma ref: X0627)) preparado en 1 litro de solución reguladora de fosfato 50 mM (pH 7). Una vez que el top agar solidificó, las placas se colocaron a 65°C, durante 4 horas. Para la visualización de la actividad, las placas se tiñeron con una solución rojo Congo (10 g de rojo Congo en 1 litro de solución reguladora de fosfato pH 7.0) durante 15 minutos. La solución teñida se descartó y las

placas se lavaron con NaCl 1M. Esta etapa de lavado se repitió dos veces. Los clones positivos aparecieron por la formación de un halo claro pálido sobre el rojo (Congo) de la base. Finalmente, 9 clones de xilanasa positivos se identificaron.

5 La xilanasa que produce los transformantes de *Aspergillus*, como se identificó en el ensayo de placa de xilanasa, se cultivaron en fermentación de matraz oscilante³. Las muestras del medio se tomaron después de 5 días de fermentación y se analizaron para actividad de xilanasa de la siguiente manera.

10 El sobrenadante (pre-diluido cuando es necesario) se diluyó 5 veces en solución reguladora de acetato de sodio 0.25M, pH 4.5. 20µl de sobrenadante diluido se transfirió a placas de microtitulación y se adicionaron 50µl de sustrato (4% (peso/v) Remazol Brilliant Blue RBBXylan (disueltos a 70°C en agua desmineralizada) y se mezclaron a fondo mediante el pipeteo arriba y abajo. La mezcla de reacción se incubó, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo mediante la adición de 200 µl de 96% de etanol e incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de que la reacción se ha terminado las placas de microtitulación se centrifugaron, durante 10 minutos a 2500rpm en una centrífuga GPK Beckman a temperatura ambiente. 100µl del sobrenadante se transfirió a una nueva placa de microtitulación y la absorbancia del color azul se midió espectrofotométricamente a 15 620nm en un Anthosreader (Proton and Wilton). La actividad específica se calculó a partir de una curva de calibración utilizando un estándar de xilanasa disuelto en solución reguladora de acetato de sodio 0.25M pH 4.5.

EJEMPLO 5: Análisis genéticos de transformantes positivos

20 Los transformantes positivos (re-confirmados) identificados en el Ejemplo 4 se cultivaron sobre medio líquido, el micelio se cosechó y se aisló el ADN total (cromosomal) utilizando el Sistema de Aislamiento Puregene (Biozym B.V.) para el aislamiento de ADN del hongo filamentoso. El aislamiento y la purificación del ADN se realizaron de acuerdo con protocolo del fabricante, pero ligeramente modificado: se repitieron las etapas de precipitación de la proteína 3 y 4.

25 El ADN cromosomal se utilizó como una plantilla en una reacción PCR, que utiliza los cebadores 12207 (SEQ ID No. 4) y 11937 (SEQ ID No. 3) para amplificar el o los insertos presentes en el casete de expresión integrado en el ADN cromosomal.

Los PCRs directos sobre los transformantes se realizaron de acuerdo con una versión adaptada de un protocolo conocido⁴, excepto que el micelio obtenido posteriormente se trató con Glucanex™ (Novo Nordisk) a concentraciones de 5mg/ml en lugar del NOVOzyme.

30 Las reacciones de PCR contenidas en la solución reguladora eLONGase™ B (Life Technologies, Breda, The Netherlands), los dNTPs (200 µM de cada uno), 1µl de Mezcla de Enzima elongate™, 1-5µl de plantilla, y 10-30pmol de cada oligo, en un volumen final de 50µl. La cantidad óptima de oligos se determinó experimentalmente para cada lote comprado. En promedio, se utilizaron 10 a 30 pmol. Las reacciones se realizaron con las siguientes condiciones del ciclo: 1x(2 min) 94°C, 35x(1 min 94°C, 1 min 55°C, 6 min 72°C), 1x(7 min 72°C). Las muestras se cargaron en geles de agarosa para análisis de los productos PCR.

35 El producto de PCR obtenido así se subclonó en el vector de clonación pcr2.1 de *E. coli* (Invitrogen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante), dando como resultado un plásmido pGBXEA-1. La cepa de *E. coli* que hospeda el plásmido pGBXEA-1, se ha depositado en el Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands bajo el número de acceso CBS 102183.

40 El producto de PCR subclonado fue secuenciado. La secuencia de nucleótido resultante de la región codificante se representa en SEQ ID NO 1 y la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína en SEQ ID NO 2. Esta proteína se ha denominado XEA.

EJEMPLO 6: Caracterización de *Talaromyces emersonii* xilanasa

Definición de Unidad Endo xilanasa (EXU) para esta especificación

45 La unidad de actividad de xilanasa (EXU) se define como la cantidad de enzima (endol endo-1,4-β-xilanasa de *Asp. nige*³¹) que libera 4.53µmol de azúcares reductores (medido como equivalentes de xilosa) por minuto bajo condiciones de ensayo. Las condiciones de ensayo comprenden: 5mg/ml de arabinoxilano de harina de trigo (Megazyme, Australia, 2/11 Ponderosa Parade, Warriewood NSW 2101) en solución reguladora de citrato de sodio 100mM (pH 3.5), temperatura 40°C, en un tiempo de reacción de 60 minutos. Las reacciones se prepararon mediante la adición de NaOH 1M. La detección se hizo colorimétricamente a 420nm después de la incubación las 50 muestras con Fe-III-hexacianida durante 15 minutos en agua hirviendo. El reactivo hexacianoferrato se preparó mediante disolución de 1.17g de KFe(CN) y 19.5g de carbonato de sodio anhidro en 1 litro de agua.

Ensayo Viscosimétrico

Además de la anterior determinación absoluta de actividad de xilanasa, se utilizó un método relativo que siguió la disminución en la viscosidad de una solución de trigo arabinoxilano (Megazyme, Australia, 2/11 Ponderosa Parade, Warriewood NSW 2101) bajo la adición de una cierta cantidad de enzima. El trigo arabinoxilano se disolvió en solución reguladora de citrato de sodio 0.425M (pH 3.5) a una concentración de 8.3mg/ml. El sustrato se incubó a 55°C, durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó una pequeña cantidad de enzima (en el rango 0.01-0.05 Unidades/ml) y la reacción se dejó proceder. Después del tiempo de reacción de 60 minutos la viscosidad de la muestra se determinó con relación a una referencia que se incubó con un estándar endo-xilanasa de *Aspergillus niger*³¹ de actividad de EXU conocida. Las actividades absolutas en EXU para el estándar se determinaron mediante el método de reducción de azúcar utilizando Fe-III-hexacianida como se describe anteriormente. La viscosidad se determinó manualmente utilizando un equipo de viscosidad con caída de bola Haake.

Reducción de Análisis de Actividad de Azúcares

La actividad de enzima de acuerdo con la definición XPU se midió mediante la detección de azúcares reductores utilizando ácido 4-hidroxibenzoico hidrazida (PAHBAH). Una XPU de actividad se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un μmol de azúcares reductores producidos por minuto de trigo arabinoxilano a pH 5.0 y 60°C durante 15 minutos, utilizando una curva de calibración de D(+)-xilosa. Este es un ensayo conocido³² con una modificación es para el reactivo PAHBAH de la siguiente manera: citrato de trisodio 0.05M, Na_2SO_3 0.1M, CaCl_2 0.02M, NaOH 0.5M y ácido p-hidroxibenzoico hidrazida 0.1M (PAHBAH). El pH final fue 12. El reactivo que contiene PAHBAH en solución alcalina, almacenado a temperatura ambiente, se utilizan dentro de un día. La absorbancia se midió a 420nm. Un blanco se preparó mediante la adición de 100 μl de solución reguladora de acetato de sodio 0.1M en lugar de solución de enzima. La actividad de xilanasa se ensayó mezclando 100 μl de solución de enzima (diluida) con 400 μl de 0.35 % de trigo arabinoxilano (Megazyme) en solución reguladora de acetato de sodio 0.1M (pH 5.0). Las tazas de Eppendorf con el sustrato se preincubaron durante 5 minutos a 60°C. La reacción se inicia mediante la adición de la solución de enzima. Después de 15 minutos la adición de 1.0ml de reactivo PAHBAH termina la reacción. Las tazas de Eppendorf se calentaron durante 5 minutos a 100°C y luego se enfrió sobre hielo. Las muestras se centrifugaron a la velocidad apropiada con el fin de centrifugar de los materiales sólidos por ejemplo 1 minuto a velocidad completa en una Beckman Microfuge E. La absorbancia se midió a 420nm. Un blanco se preparó por la adición de 100 μl en lugar de solución de enzima. La medición del rango es 0.01 - 0.1 de XPU/ml.

Purificación de la xilanasa

10.45g de sulfato de amonio se adicionaron a 43 ml de caldo de célula libre y se llevó en una columna Ethyl Sepharose™ utilizando Columna Äkta explorer 100 (Pharmacia Biotech): 15 Fuente ETH (código 17-0146-01, Pharmacia Biotech) (D=1.6cm, l=4.8cm, V=9.6ml). La columna se equilibró con acetato de sodio 100 mM y 40 % de sulfato de amonio saturado pH 5.0. La elución utilizó un gradiente lineal que conduce a acetato de sodio 100mM (pH 5.0) en 20 volúmenes de columna. Tamaño de fracción: 5ml. Velocidad de flujo: 10ml/minuto. Longitudes de onda monitoreadas: 280, 254, 214nm. Las fracciones se ensayaron para xilanasa y se analizaron por Cromatografía de Exclusión de Tamaño-HPLC (SEC).

Las fracciones de xilanasa más puras se adicionaron a una columna Sephacryl S200 de acuerdo con las siguientes condiciones. Equipo Äkta explorer 100 (Pharmacia Biotech). Columna: HiPrep 16/60 Sephacryl S200 HR (Pharmacia Biotech). El equilibrio y la elución se realizaron con acetato de sodio 100mM (pH 5.0). Velocidad de flujo: 1 ml/min. Tamaño de fracción: 4ml. Longitudes de onda monitoreadas: 280, 254, 214nm. La pureza de las fracciones de elución se analizó por HPLC-SEC, SDS-PAGE y PAGE nativa.

Concentración de proteína

La concentración de proteína se determinó mediante la medición del OD280. La xilanasa (madura) de *T.emersonii* contiene 11 residuos Trp (posiciones 72, 108, 115, 121, 148, 300, 302, 308, 322, 377 y 385) y 23 residuos Tyr (posiciones 36, 51, 109, 141, 146, 161, 167,169, 174, 192, 193, 196, 200, 218, 281, 306, 316, 326, 332, 348, 395, 403 y 404). El coeficiente de extinción molar calculada fue 89530 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. El peso molecular fue 41,637g/mol. El OD280 para 1 mg/ml de XEA fue 2.15.

Actividad Específica de la xilanasa de *T.emersonii* (XEA)

La actividad específica se determinó utilizando el método PAHBAH azúcar reductor a 40°C y 60°C. La actividad específica para XEA fue 150 XPU y 500 XPU a estas dos temperaturas respectivamente. La concentración de proteína se determinó por análisis de OD280.

Temperatura (°C)	Actividad Específica (XPU/mg)
40	150
60	500

Secuencia N-terminal

La secuencia de aminoácidos N-terminal de la XEA madura purificada se encontró que era: Ala-Gly-Leu-Asn-Thr-Ala (en la secuencia madura este primer residuo Ala es Ala²³ en SEQ. ID. No. 2).

5 Punto Isoeléctrico (IEP)

Equipo: Sistema Phast (Pharmacia Biotech), IEF 3-9 Phastgels (Pharmacia Biotech). Los geles se corrieron y tiñeron (Coomassie) de acuerdo con protocolos estándar del Sistema Phast proporcionados por el fabricante. El IEP determinado por el enfoque isoelectrico utilizando PhastGel IEF3-9 fue aproximadamente 3.3.

Peso Molecular

10 La electroforesis SDS-PAGE se realizó utilizando el Sistema Phast (Pharmacia Biotech), Phastgels (Pharmacia Biotech), tiras de solución reguladora SDS/tiras de solución reguladora nativa (Pharmacia Biotech).

15 Tratamiento de la muestra: un volumen de solución reguladora (Tris-HCl 500mM pH 6.8, 10% de SDS, 0.1 % de Bromo-azul fenol) se mezcló con 4 volúmenes de muestra y se hirvieron durante 3 minutos. Los geles se corrieron y tiñeron (Coomassie o Silver) de acuerdo con métodos estándar del Sistema Phast. El peso molecular bajo SDS-PAGE utilizando marcadores de peso molecular (Pharmacia) fue aproximadamente 63kD. El peso molecular calculado con base en la composición del aminoácido es 41,637 Daltons.

20 Además el peso molecular se determinó por cromatografía de permeación en gel utilizando estándares de peso molecular de filtración en gel (BIORAD, cat. no. 151-1901). El peso molecular determinado por SEC de alto rendimiento fue 42 kD. (HP-SEC se realizó utilizando una columna TSK G3000SW (cat. no. 05103, Toso Haas). Las muestras fueron eluidas en fosfato de sodio 0.1M (pH7) a 1ml/min a temperatura ambiente. La detección se realizó a 280nm). El peso molecular alto según se observa en SDS-PAGE parece ser una sobre estimación. esto probablemente es causado por la glicosilación de la xilanasas.

Desglicosilación

25 5µl de enzima purificada (ca. 5mg/ml) se mezclaron con 20µl de 0.5% de SDS y 25µl de 1% mercapto-etanol. La mezcla se hirvió durante 4 minutos. Después de enfriar, se adicionaron 20µl de N-glicosidasa F (500U/ml) y 20µl de 3% de Triton X-100 en solución reguladora de fosfato de sodio 1M (pH 7.0). Este luego se incubó durante la noche a 37°C y la desglicosilación se analizó con SDS-PAGE. La secuencia de aminoácidos sugiere 2 sitios de glicosilación (Asn⁵⁶ y Asn¹²³, ver SEQ ID No. 2).

30 SDS-PAGE muestra que la xilanasas tratada con N-glicosidasa F migra más y el peso molecular es inferior que la xilanasas sin tratar o la pre-tratada (hervida con SDS y β-mercapto-etanol). Así el peso molecular alto sorprendentemente observado en SDS-PAGE probablemente se causa por glicosilación.

Perfil de Temperatura y pH

35 El caldo de célula libre se analizó para actividad de xilanasas a diferentes pH y temperatura. La actividad de xilanasas se analizó con el método de azúcares reductores utilizando PAHBAH a pH 4 a varias temperaturas (ver Tabla 1A) o a 60°C a diferentes pH (Tabla 1B). La Tabla 1A muestra que la temperatura óptima de XEA es alrededor de 80°C. La Tabla 1 B muestra que el pH óptimo de XEA está entre pH 4 y pH 5 (existen dos columnas de cifras, ya que los experimentos se realizaron dos veces).

Tabla 1A: Dependencia de la Temperatura de Xilanasa

Temperatura (°C)	Actividad (μM xilosa/15min)	Actividad Relativa (%)
30	20-30	10
40	40-50	19
50	90-100	40
60	120-130	52
70	195-205	83
80	235-245	100
90	65-75	29

Tabla 1B: Dependencia pH

pH	Actividad (μM xilosa/15 minutos)	Actividad (μM xilosa/15 minutos)
3.0	118.1	123.4
3.5	141.8	127.8
4.0	145.2	148.3
4.5	140.8	149.1
5.0	117.9	124.8
5.5	91.7	99.1
6.0	57.3	60.1

5 Termoestabilidad

El análisis de Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC) de temperatura de despliegue

La temperatura de despliegue de XEA se determinó utilizando DSC. Las condiciones de medición utilizadas fueron con solución reguladora de acetato de sodio (pH 5), 2-4mg/ml, y una velocidad de calentamiento de 2.5°C/min. Se encontró que la temperatura de despliegue (Td) de XEA era 80.1°C.

10 Medición T50

T50 es la temperatura en la cual 50% de actividad residual se pierde después de 20 minutos de incubación y por lo tanto es una medida de la termoestabilidad. Las incubaciones T50 se realizaron de la siguiente manera. La muestra de xilanasa se diluyó de manera que concentración final de la xilanasa estuvo dentro de la medición de rango para la prueba PAHBAH (unidades XPU). Entonces se diluyó con solución reguladora de acetato de sodio 0.1M (pH 5.0) que contiene 1mg/ml de BSA para evitar un enlace específico de y la desnaturalización en las superficies de los tubos. La solución reguladora se pre-calentó a 60, 70, 80, 85 y 90°C en un termomezclador, durante 5 minutos y posteriormente la xilanasa se adicionó. Las muestras se calentaron durante 20 minutos y se enfriaron en hielo. La actividad se midió utilizando la prueba PAHBAH.

En la Tabla 2, se muestra el porcentaje de actividad residual con respecto al control no-incubado después de 20 minutos de incubación a la temperatura dada. De esta tabla, se puede derivar la T50: fue 82°C.

Tabla 2 : Termoestabilidad de la xilanasa XEA

Temperatura (°C)	Actividad Residual (%)
40	100
50	104
60	103
70	99
75	90
80	85
85	8
90	1

Además, los valores de T50 se midieron a diferentes pH y en la presencia de EDTA. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

- 5 Tabla 3: Determinación de la influencia del pH y los metales iónicos en la estabilidad de XEA. (¹ pH 7 y 8: muy pocos puntos de datos en la zona de temperatura baja)

pH	T50 (°C)
3	73
3.5	77
4	80
4.5	80
5	81
5 (+EDTA)	81
6	75
71	<72
81	<72

- 10 XEA es más estable en la zona de pH de pH 4 hasta pH 5. Por debajo de pH 3.5 y por encima pH 5.5 la termoestabilidad inicia a declinar pero aún es significativamente mejor que la mayoría de los hongos xilanasas conocidos actualmente. La presencia de EDTA no influye la T50. Esto significa que para la estabilidad de XEA no es dependiente en metales iónicos positivos que se acomplejan mediante EDTA.

EJEMPLO 7: Uso de la *Talaromyces xilanasa* (XEA) en pienso para animal

- 15 Se realizó una prueba utilizando pollos de engorde machos (Cobb). De 1 a 5 días de edad se mantuvieron en corrales de piso y se les ofrece un pienso de ración alimentaria para pollo de asar comercial. A la edad de 5 días, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 54 jaulas, basándose en sus pesos individuales. 15 pollos de engorde fueron alojados por jaulas de 5-19 días de edad. En el día 19, el número de animales por jaulas se redujo a

12. Seis jaulas fueron asignadas a un tratamiento. Dado que las jaulas es la unidad experimental, esto significa que hubo seis réplicas por tratamiento.

5 Las jaulas se instalaron en una casa de pollo de engorde ventilada, iluminada y con calentamiento artificial, utilizando un sistema de jaulas de tres niveles. Cada jaula tenía una superficie de 0.98m², y tenía un piso de alambre. El cuarto se iluminó 24 horas/día, pero la intensidad de la luz se disminuyó gradualmente durante la prueba. También la temperatura se disminuyó gradualmente: de 28°C durante la primera semana a 23°C durante la última semana. La humedad durante la prueba se mantuvo a aproximadamente 60%. Los animales se vacunaron de acuerdo con el programa de vacunación normal contra la Bronquitis Infecciosa y Enfermedad de New Castle.

10 Nueve tratamientos se incluyeron en esta prueba. Para una dieta basándose en trigo (ver Tabla 4), no se adicionó enzima (control), o una cantidad igual a aproximadamente 2500, 5000, 10000 o 25000 EXU/kg de pienso de ya sea la endoxilanasas de *Talaromyces* (XEA) o una endoxilanasas de *Aspergillus niger* (Endol, un endo-1,4-β-endoxilanasas³¹ disponible comercialmente de DSM N.V., Agri Ingredients, Delft, The Netherlands) como control. Las enzimas se adicionaron al pienso en la forma de un producto granulado que se mezcló en una premezcla antes de mezclar en la dieta. Las dietas se ofrecieron *ad libitum* a los animales en la forma de un pellet. Durante el proceso de peletización la temperatura de los pellets no excedieron de aproximadamente 70°C. El agua también estuvo disponible libremente.

15 La ganancia de peso corporal (BWG) y la relación de conversión del pienso (FCR) se determinaron para los periodos de 5-19 días de edad y 5-33 días de edad.

Tabla 4: Composición del pienso y contenidos de los nutrientes principales

Ingrediente	Contenido (%)
Trigo	50.0
Arroz	10.0
Harina de soja	20.0
Soja de grasa completa (tostada)	1.5
Mandioca	1.69
La carne y harina de hueso	5.5
Harina de pescado	2.0
Grasa animal mezclada	6.0
Premezcla de vitaminas y minerales	1.0
Caliza	0.85
Fosfato monocalcio	0.75
Sal	0.3
L-lisina.HCl	0.16
DL-metionina	0.22
L-treonina	0.03
ME _{pollos de engorde} (MJ/kg)	12.0

(continuación)

Ingrediente	Contenido (%)
Proteína cruda (%)	21.4
Grasa cruda (%)	8.5
Lisina digerible (%)	1.06
Metionina + cisteína digerible (%)	0.78
* La dieta contenía niveles de vitamina y en trazas de minerales muy comunes en los Países bajos. No se adicionaron promotores de crecimiento de antibióticos ni coccidiostáticos a las dietas.	

5 Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 5, que muestra la BWG y FCR promedio de los pollos de engorde en dos periodos. Las adiciones de enzima se indican en unidades de actividad (EXU). A medida que la BWG aumenta, ya que la FCR disminuye como FCR es la cantidad de pienso (g) necesaria para el crecimiento.

Tabla 5

	BWG (g/pájaro)		FCR (g/g)	
	5-19 días	5-33 días	5-19 días	5-33 días
Control	647	1665	1.486	1.749
<i>Talaromyces</i> (XEA, invención)				
+ 2500 EXU/kg	668	1696	1.447	1.666
+ 5000 EXU/kg	683	1757	1.419	1.647
+ 10000	662	1736	1.444	1.673
EXU/kg				
+ 25000 EXU/kg	676	1731	1.429	1.656
Endol <i>Aspergillus niger</i> (para comparación)				
+ 2500 EXU/kg	682	1742	1.440	1.659
+ 5000 EXU/kg	682	1730	1.458	1.704
+ 10000 EXU/kg	672	1686	1.417	1.662
+25000 EXU/kg	696	1743	1.466	1.685

10 Tanto el crecimiento y FCR significativamente ($P < 0.05$) mejorado para las dietas que contienen las enzimas, tanto después de 14 días del periodo experimental como después del periodo experimental total. Unas pocas diferencias se observaron entre las dosis diferentes, pero la enzima XEA fue tan bueno como (si no mejor que) la enzima comercialmente disponible.

EJEMPLO 8: Rendimiento del horneado de la endoxilanasas *Talaromyces emersonii* (XEA)

5 Preparación del pan de molde en un proceso de horneado estándar se realizó mediante la mezcla de 3500g de harina de trigo (una mezcla de 80% de Kolibri y 20% de harina de trigo Ibis (Meneba, Holland) a aproximadamente 21°C), 77g de (Konings) levadura comprimida, 70g de sal, 25ppm de ácido ascórbico, 10ppm de α -amilasa fúngica Fermizyme™P200, (DSM N.V., Bakery Ingredients, Delft, The Netherlands) y diferentes cantidades de la enzima endoxilanas XEA y 2030mL de agua (8-15°C) en un mezclador espiral (Hobart) durante 2 minutos (a velocidad 1) y durante aproximadamente 6 minutos (a velocidad 2) para poner en 125Wh (Watt-horas) de energía. La temperatura de la masa fue 28°C. La maquinabilidad de la masa se analizó manualmente por un panadero cualificado.

10 Después de mezclar directamente, la masa se dividió en 6 piezas cada una de 875g, redondeado y corregido durante 35 minutos en una cabina de fermentación a 34°C y 85% de RH (humedad relativa). En el final de este periodo las masas se formaron y panorámica y dando una fermentación final de 75 minutos en una cabina de fermentación a 38°C y 87% de RH. Posteriormente, las masas fermentadas completamente se hornearon en un horno eléctrico a 210°C durante 30 minutos. Después de enfriar a temperatura ambiente los volúmenes de las hogazas de pan se determinaron mediante el método de desplazamiento de semilla de colza. Después de 16-24 horas de almacenamiento en bolsas de polietileno sellado a temperatura ambiente la calidad de la miga se evaluó por un panadero cualificado. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Nivel de dosificación de XEA (EXU/kg de harina)	Volumen de hoja (mL) (%)		Manipulación de la masa	Rendimiento del horneado (escala 0-10)	Calidad de las migas (escala 0-10)
0	4123	100	fácil, no pegajosa	6	6
176	4420	107	más fácil, no pegajosa	7	7
527	4756	115	más fácil, no pegajosa	7.5	7
1581	4794	116	fácil, algo pegajosa	7.5	7.5

20 La calidad de las masas fue muy buena. Sólo a la dosis más alta de endoxilanas XEA tuvo una pequeña pegajosidad, experimentada durante la manipulación de la masa. Sin embargo esta pequeña pegajosidad no influyó en la maquinabilidad de la masa. Todas las masas que contienen endoxilanas XEA fueron muy flexibles y fáciles de manipular.

A partir de estos resultados de horneado, se concluyó que la endoxilanas XEA es muy efectiva en la mejora de la calidad del pan, tanto en términos de volumen del pan y en términos de calidad de la miga. A pesar de los grandes volúmenes de las hogazas de pan, la estructura de la miga era muy regular y fina.

25 **EJEMPLO 9 y EJEMPLO COMPARATIVO 10: Comparación de rendimiento de horneado de la enzima (XEA) de *Talaromyces emersonii* con endoxilanas a partir de *Asp. niger***

30 El rendimiento de horneado de XEA se comparó en producción de pan de molde Dutch con una endoxilanas de hongos utilizada actualmente del *Aspergillus niger*. Esta endoxilanas del *A. niger* se suministró en su forma comercialmente disponible pura, i.e. Fermizyme™ HSP6000. Fermizyme™ HSP es una buena enzima para la aplicación en la elaboración del pan, pero puede introducir pegajosidad de la masa y no siempre proveen un aumento suficiente del volumen del pan.

El procedimiento exacto del Ejemplo 7 se repitió, excepto que se utilizaron diferentes cantidades de ambas la endoxilanas XEA o Fermizyme™ HSP₆₀₀₀.

Los resultados se muestran en la Tabla 7.

35

Tabla 7

Ejemplo No.	Nivel de dosificación (EXU/kg de harina)	Volumen de hoja (mL) (%)		Manipulación de la masa	Romper & triturar (escala 0-10)	Calidad de las migas (escala 0-10)
9: endoxilanasas XEA	0	4170	100	Buena, no pegajosa	6	6
	264	4430	106	Buena, no pegajosa	6.5	7.5
	528	4647	111	Buena, no pegajosa	7	7.5
	1056	4761	114	Flexible, no pegajosa	7.5	8
	1584	4880	117	Flexible, poco floja, No pegajosa	5#	7.5
10:Fermizyme™ HSP ₆₀₀₀	0	4170	100	Buena, no pegajosa	6	6
	264	4304	103	Flexible, no pegajosa	6.5	6
	528	4355	104	Flexible, poco pegajosa	6.5	7
	1056	4539	109	Flexible, pegajosa, poco flojo	7	7.5
	1584	4698	113	Flexible, pegajosa, poco floja	7.5	8
# volumen del pan fue demasiado grande, por lo que se forma un pan con forma de hongo.						

5 A partir de los resultados es evidente que la endoxilanasas XEA no introdujo la pegajosidad en la masa, y volumen del pan mejorado a una mayor medida que la obtenida introduciendo Fermizyme™ HSP. Por otra parte, menos unidades de endoxilanasas/kg de harina fueron necesarios para alcanzar un cierto nivel en el volumen del pan cuando XEA se utilizó en lugar de Fermizyme™ HSP. La calidad de la rotura y trituración fue similar a volúmenes equivalentes. La estructura de la miga obtenida por la adición de XEA fue al menos tan buena como la obtenida con Fermizyme™ HSP.

10 En general, la endoxilanasas XEA resuelve algunos de los problemas en la masa y elaboración del pan utilizando Fermizyme™ HSP. No se introdujo pegajosidad en la masa, los volúmenes del pan obtenidos fueron grandes y la estructura de la miga, a pesar de los mayores volúmenes, era muy regular y fina.

EJEMPLO 11: Pruebas de Estabilidad del pelletizado

15 El almidón de maíz (4543g) se colocó en un Erweka™ Z-kneader. Luego 1069g de una fermentación de forma ultrafiltrado que contiene la xilanasas de la invención (lote XEA 502-8m, que tuvo 43,553 EXU/g y 6.7% de materia seca) se adicionó al almidón durante la mezcla para obtener una mezcla húmeda que tuvo alrededor de 15,000 EXU/g (cuando se seca 94% de materia seca). Después de que el líquido se ha adicionado, se continúa la mezcla durante otros 10 minutos.

En una cámara de vacío de secado (40°C) la mezcla se secó durante 12 horas a 94.5% de materia seca. A continuación, se molió en un molino Erweka™ Freewitt a través de un tamiz de 1 mm. Este fue el Ejemplo 11A.

La misma receta se repitió utilizando Lyxasan™ Batch OP 0036 (que contiene la endo-1,4-β-endoxilanasas³¹ disponible comercialmente de DSM N.V., Agri Ingredients, Delft, The Netherlands). A 5885g de almidón, se le adicionaron 1984g de UF (ultrafiltrado) con 42,550 EXU/g y 3.7% de materia seca. Esta mezcla se secó a 94% de materia seca y se molió como en el Ejemplo 11A (esto forma el Ejemplo Comparativo 11B).

- 5 La tercera muestra es un producto cubierto comercialmente denominado Biofeed Trigo CT que es disponible comercialmente de Novo Nordisk, Denmark. Este contiene una xilanasas del tipo G de *Thermomyces lanuginosus* y tiene una cubierta de grasa (Ejemplo Comparativo 11 C).

- 10 Las tres muestras se ensayaron en un ensayo de peletizado a tres diferentes temperaturas. A un pienso para animal (la composición se muestra en la Tabla 8, abajo), la mezcla de enzima se adicionó a dos diferentes concentraciones, 0.24% (11A) y 0.1% (11B, 11C). Después la mezcla del pienso se calentó con vapor en un acondicionador de hasta 65°C, 75°C o 85°C y posteriormente se peletizó a través de una placa de die espesor de 65mm con orificios de 5mm de diámetro. Se enfrió inmediatamente. La actividad residual en los pellets a continuación se midió y los resultados de las pruebas de estabilidad se muestran en la Tabla 9.

Tabla 8: Composición de Pienso de Animal

Materias Primas	Contenido (%)
Maíz	20.00
Trigo	30.00
Soja (tratada térmicamente)	10.00
Soja (harina) (46.7 cp)	22.50
Tapioca	5.07
Harina de Pescado (70% cp)	1.50
Harina de Plumas (hidrolizada)	1.00
Aceite de Soja	1.30
Grasa de Animal	4.50
Pre-mezcla de Vitaminas/Minerales (Maíz)	1.00
Caliza	1.300
Fosfato monocalcio	1.20
Sal	0.32
L-lisina	0.12
DL-metionina	0.19

Tabla 9: Estabilidades del Peletizado de las Enzimas

Actividad Residual (%)	Ejemplo 11A	Ejemplo Comparativo 11B	Ejemplo Comparativo 11C
65°C	84	64	86
75°C	82	16	83
85°C	66	4	56

Como se puede ver, la estabilidad a alta temperatura (85°C) la proteína de la invención XEA proporcionó resultados considerablemente mejores que el producto comercial comercializado actualmente.

5 EJEMPLO 12: Actividad en Aril-β-D-xilosidos

Los dos sustratos 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-xilopiranosida (CAS Reg de No. 207606-55-1, también denominada X-b-D-xil) y 4-umbelliferil-β-D-xilopiranosida (CAS Reg de No. 6734-33-4, también denominada 4-MU-b-D-xyl) se utilizaron con el fin de seleccionar la actividad de la xilosidasa. Se adicionaron directamente al medio. Las cepas que componen la biblioteca se organizaron en el formato de placa de 96 pozos. De esta manera, la placa maestra se replicó fácilmente en medio de detección. La biblioteca se cultivó sobre medio selectivo (0.52 g/l de KCl, 1.52 g/l de K₂HPO₄, 0.52 g/l de MgSO₄, 2% de glucosa, acetamida 10 mM, 1/1000 elementos trazas (2.2g de ZnSO₄/7H₂O, 1.1g de H₃BO₃, (0.5g de FeSO₄/7H₂O, 0.17g de CoCl₂/6H₂O, 0.16 g de CuSO₄/5H₂O, 0.15 g de NaMoO₄/2H₂O, 5.0 g de EDTA, pH ajustado a 6.5 con KOH y esterilizado por filtración 0.45μm), pH ajustado con KOH (10N a 6) que contiene cualquiera X-b-D-xyl o 4-MU-b-D-xyl (a una concentración de 200 mg/l y 150 mg/l respectivamente). X-b-D-xyl se ha disuelto previamente en un volumen mínimo de dimetil formamida (DMF). Las placas se incubaron a 33°C, durante 48 horas y luego se incubaron, durante 6 horas a 65°C. Las placas se valoraron antes y después de la incubación 6hr, 65°C. Las lacas X-xyl se analizaron directamente basándose en la presencia (o no) de un halo de color azul turquesa que se encontró que estaba presente. La detección de actividad de xilosidasa en placas 4-MU-xyl se comprobó colocando la placa bajo luz UV de longitud de onda 310nm. Los clones positivos aparecieron rodeados por un halo azul fluorescente.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> DSM N.V.

<120> Talaromyces Xylanases

<130> N80068A

25 <140> PCT/EP00/09257

<141> 2000/09/21

<150> EP 99203100.5

<151> 1999-09-22

<160> 4

30 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1227

<212> ADN

<213> Talaromyces emersonii

35 <220>

ES 2 394 481 T3

<221> CDS

<222> (1)..(1227)

<400> 1

atg gtt cgc ctc agt cca gtc ttg ctc gcc tcc atc gca ggc tct ggc	48
Met Val Arg Leu Ser Pro Val Leu Leu Ala Ser Ile Ala Gly Ser Gly	
1 5 10 15	
ctg cct cta gcc caa gca gca ggc ctc aac aca gcc gcc aaa gcc atc	96
Leu Pro Leu Ala Gln Ala Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Ile	
20 25 30	
ggc ctg aaa tac ttt ggc aca gcg acc gac aac ccc gag ctg agc gac	144
Gly Leu Lys Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp	
35 40 45	
acc gcg tac gag acg cag ctc aac aac acg cag gat ttc ggg cag ttg	192
Thr Ala Tyr Glu Thr Gln Leu Asn Asn Thr Gln Asp Phe Gly Gln Leu	
50 55 60	
acg ccg gcg aat tcg atg aag tgg gat gcc acc gag ccc gag cag aat	240
Thr Pro Ala Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Glu Gln Asn	
65 70 75 80	
gtc ttc acg ttt agc gcc ggc gat cag att gcc aac ttg gcc aag gcg	288
Val Phe Thr Phe Ser Ala Gly Asp Gln Ile Ala Asn Leu Ala Lys Ala	
85 90 95	
aat ggc cag atg ttg cgg tgt cat aat ctt gtt tgg tac aat cag ttg	336
Asn Gly Gln Met Leu Arg Cys His Asn Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu	
100 105 110	
ccg tcg tgg gtc acc agt ggc tcc tgg acc aac gag acg ctg ctt gct	384
Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Ser Trp Thr Asn Glu Thr Leu Leu Ala	
115 120 125	
gcc atg aag aat cac atc acc aac gtc gtt acc cat tac aag gcc cag	432
Ala Met Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Gln	
130 135 140	
tgc tac gca tgg gat gtc gtt aat gag gcc ctc aac gac gac ggc acc	480
Cys Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr	
145 150 155 160	

ES 2 394 481 T3

tac	cgc	agc	aac	gtc	ttc	tac	cag	tac	atc	ggg	gag	gcg	tac	atc	ccc	528
Tyr	Arg	Ser	Asn	Val	Phe	Tyr	Gln	Tyr	Ile	Gly	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	
				165					170					175		
atc	gcc	ttc	gcg	acg	gcc	gcc	gcc	gcc	gac	ccc	aac	gcc	aag	ctg	tac	576
Ile	Ala	Phe	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Asp	Pro	Asn	Ala	Lys	Leu	Tyr	
			180					185					190			
tac	aac	gac	tac	aac	atc	gag	tac	ccg	ggg	gcc	aag	gcg	acg	gcg	gcg	624
Tyr	Asn	Asp	Tyr	Asn	Ile	Glu	Tyr	Pro	Gly	Ala	Lys	Ala	Thr	Ala	Ala	
		195					200					205				
cag	aac	ctg	gtc	aag	ctg	gtg	cag	tcg	tac	ggc	gcg	cgc	atc	gac	ggc	672
Gln	Asn	Leu	Val	Lys	Leu	Val	Gln	Ser	Tyr	Gly	Ala	Arg	Ile	Asp	Gly	
	210				215						220					
gtc	ggc	ctg	cag	tcg	cac	ttc	atc	gtg	ggc	gag	acg	ccc	agc	acc	agc	720
Val	Gly	Leu	Gln	Ser	His	Phe	Ile	Val	Gly	Glu	Thr	Pro	Ser	Thr	Ser	
225				230						235					240	
tcc	cag	cag	cag	aac	atg	gcc	gcc	ttc	acg	gcg	ctg	ggc	gtc	gag	gtc	768
Ser	Gln	Gln	Gln	Asn	Met	Ala	Ala	Phe	Thr	Ala	Leu	Gly	Val	Glu	Val	
				245					250					255		
gcc	atc	acc	gag	ctc	gac	atc	cgc	atg	cag	ctg	ccc	gag	acg	gaa	gcc	816
Ala	Ile	Thr	Glu	Leu	Asp	Ile	Arg	Met	Gln	Leu	Pro	Glu	Thr	Glu	Ala	
			260					265						270		
ctg	ctg	acg	cag	cag	gcc	acc	gac	tac	cag	agc	acc	gtg	cag	gcc	tgc	864
Leu	Leu	Thr	Gln	Gln	Ala	Thr	Asp	Tyr	Gln	Ser	Thr	Val	Gln	Ala	Cys	
		275					280					285				
gcc	aac	acc	aag	ggc	tgc	gtc	ggc	atc	acc	gtc	tgg	gac	tgg	acc	gac	912
Ala	Asn	Thr	Lys	Gly	Cys	Val	Gly	Ile	Thr	Val	Trp	Asp	Trp	Thr	Asp	
	290					295					300					
aag	tac	tcg	tgg	gtg	ccc	agc	acc	ttc	tcg	ggc	tat	ggc	gac	gcc	tgt	960
Lys	Tyr	Ser	Trp	Val	Pro	Ser	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Gly	Asp	Ala	Cys	
305					310					315					320	
ccc	tgg	gac	gcc	aac	tac	cag	aag	aag	ccc	gcg	tac	gaa	ggc	atc	ctc	1008
Pro	Trp	Asp	Ala	Asn	Tyr	Gln	Lys	Lys	Pro	Ala	Tyr	Glu	Gly	Ile	Leu	
				325					330					335		
act	ggg	ctt	gga	cag	acg	gtc	acc	agc	acc	acc	tac	atc	atc	tcg	ccg	1056
Thr	Gly	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ile	Ser	Pro	
			340					345						350		
acg	acg	tct	gtc	gga	acg	ggc	acg	acg	acc	tcg	agc	ggc	gga	agc	ggc	1104
Thr	Thr	Ser	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	
		355					360					365				
ggc	acg	act	ggc	gtg	gcc	cag	cat	tgg	gag	cag	tgc	ggt	gga	ctg	ggc	1152
Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	His	Trp	Glu	Gln	Cys	Gly	Gly	Leu	Gly	
	370					375					380					
tgg	act	ggt	ccg	acg	ggt	tgc	gca	agt	ggc	tac	act	tgc	act	gtc	atc	1200
Trp	Thr	Gly	Pro	Thr	Val	Cys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Val	Ile	
385					390					395					400	
aat	gag	tat	tac	tcg	cag	tgt	ctg	taa								1227
Asn	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu									
				405												

<210> 2

<211> 408

<212> PRT

<213> *Talaromyces emersonii*

5 <400> 2

ES 2 394 481 T3

Met Val Arg Leu Ser Pro Val Leu Leu Ala Ser Ile Ala Gly Ser Gly
1 5 10 15
Leu Pro Leu Ala Gln Ala Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Ile
20 25 30
Gly Leu Lys Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Ser Asp
35 40 45
Thr Ala Tyr Glu Thr Gln Leu Asn Asn Thr Gln Asp Phe Gly Gln Leu
50 55 60
Thr Pro Ala Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Glu Gln Asn
65 70 75 80
Val Phe Thr Phe Ser Ala Gly Asp Gln Ile Ala Asn Leu Ala Lys Ala
85 90 95
Asn Gly Gln Met Leu Arg Cys His Asn Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu
100 105 110
Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Ser Trp Thr Asn Glu Thr Leu Leu Ala
115 120 125
Ala Met Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Thr His Tyr Lys Gly Gln
130 135 140
Cys Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr
145 150 155 160
Tyr Arg Ser Asn Val Phe Tyr Gln Tyr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro
165 170 175
Ile Ala Phe Ala Thr Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr
180 185 190
Tyr Asn Asp Tyr Asn Ile Glu Tyr Pro Gly Ala Lys Ala Thr Ala Ala
195 200 205
Gln Asn Leu Val Lys Leu Val Gln Ser Tyr Gly Ala Arg Ile Asp Gly
210 215 220
Val Gly Leu Gln Ser His Phe Ile Val Gly Glu Thr Pro Ser Thr Ser
225 230 235 240
Ser Gln Gln Gln Asn Met Ala Ala Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val
245 250 255
Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Met Gln Leu Pro Glu Thr Glu Ala
260 265 270
Leu Leu Thr Gln Gln Ala Thr Asp Tyr Gln Ser Thr Val Gln Ala Cys
275 280 285
Ala Asn Thr Lys Gly Cys Val Gly Ile Thr Val Trp Asp Trp Thr Asp
290 295 300
Lys Tyr Ser Trp Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Asp Ala Cys
305 310 315 320
Pro Trp Asp Ala Asn Tyr Gln Lys Lys Pro Ala Tyr Glu Gly Ile Leu

ES 2 394 481 T3

				325						330						335
Thr	Gly	Leu	Gly	Gln	Thr	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Tyr	Ile	Ile	Ser	Pro	
			340					345					350			
Thr	Thr	Ser	Val	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	
		355					360					365				
Gly	Thr	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	His	Trp	Glu	Gln	Cys	Gly	Gly	Leu	Gly	
	370					375					380					
Trp	Thr	Gly	Pro	Thr	Val	Cys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Cys	Thr	Val	Ile	
385					390					395					400	
Asn	Glu	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu									
				405												

<210> 3

<211> 28

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador #1

<400> 3

tatagcgaaa tggattgatt gtacgctc 28

10 <210> 4

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: cebador #2

<400> 4

atcccagca tcattacacc tcagtg 26

REFERENCIAS

20 1. Sambrook et al. (1989) "Molecular Cloning: A laboratory manual", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York

2. Innis et al. (1990) "PCR protocols, a guide to methods and applications" Academic Press, San Diego.

3. WO-A-99/32617

4. van Zeijl, C. et al. (1998) J. of Biotechnol. 59: 221-224

5. Devereux et al (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395
6. Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300
7. Altschul, S, F et al (1990) J Mol Biol 215:403-10
8. Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad Sci. USA 89: 10915-10919)
- 5 9. Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787
10. Cunningham and Wells, Science, 244, 1081-1085, 1989
11. de Vos et al. (Science, 255, 306-312, 1992)
12. Smith et al. (J. Mol. Biol., 224, 899-904, 1992)
13. Wlodaver et al. (FEBS Lett., 309, 59-64, 1992)
- 10 14. Ford et al, Protein Expression and Purification, 2, 95-107, 1991
15. Goosen et al, "Transformation and Gene Manipulation in Filamentous Fungi: an overview" in: Handbook of Applied Mycology, Vol. 4 (1992)
16. Romanos et al, Yeast 8:423-488 (1992)
17. EP-A-0,449,375
- 15 18. WO-A-98/04726
19. WO-A-98/30707
20. Alenkso and Clutterbuck, Fungal Genet. Biol 21: 373-397 (1997)
21. EP-A-0,635,574
22. WO-A-98/46772
- 20 23. Raper and Fennell, The Genus *Aspergillus*, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp 293-344, 1965
24. EP-A-0,184,433
25. EP-A-0,284,603
26. EP-A-0,134,048
27. EP-A-0,253,455
- 25 28. EP-A-0,096,340
29. EP-A-0,301,670
30. EP-A-0,449,375
31. EP-A-0,463,706 (Gist-brocades B.V.)
32. Lever, M., Powell, J.C., Killip, M., Small, C.W. (1973) J. Lab. Clin. Med. 82: 649-655
- 30 33. US-A-4,653,202
34. Saiki et al, Science 239: 487-491 (1988)

35. Davies et al, "*Aspergillus*: 50 years on", *Progress in Industrial Microbiology*, 29: 527-560 (1994)
36. Tuohy et al, *Biochem J.* 290: 515-523 (1993)
37. Tuohy et al, *Bioresource Technology* 50: 37-42 (1995)

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de xilanasa que comprende:
- (i) la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2; o
 - (ii) una variante de al menos 90 % de identidad de la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2, que es capaz de escindir el xilano; o
 - (iii) una variante de la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2, que tiene hasta 50 sustituciones de aminoácidos y que es capaz de escindir el xilano, o
 - (iv) un fragmento de la secuencia de aminoácidos a partir de los aminoácidos 23 a 408 de SEQ ID No. 2, que es capaz de escindir el xilano.
2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la variante (ii) tiene al menos 95 % de identidad o el fragmento de (iv) tiene al menos 150 aminoácidos de longitud o la variante de (iii) tiene hasta 30 sustituciones de aminoácidos.
3. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que escinde (1-4) enlaces o unidades de xilopiranosilo adyacentes en B-D-xilano.
4. Un polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que tiene actividad de arabinoxilanasa y xilosidasa.
5. Un polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que se obtiene de (a) un hongo; o (b) un organismo del género *Talaromyces*, opcionalmente de la especie *Talaromyces emersonii*.
6. Un polinucleótido que comprende:
- (a) la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasa o el complemento de esta o
 - (b) una secuencia codificante para un polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con cualquier reivindicación precedente;
 - (c) un fragmento de al menos 100 nucleótidos de la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasa o el complemento de esta;
 - (d) una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad a la secuencia codificante de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasa
 - (e) la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 codificante para una xilanasa o el complemento de esta o la secuencia madura de Seq ID No. 1 modificada por hasta 100 sustituciones de nucleótidos;
 - (f) una secuencia codificante para una xilanasa que se degenera como resultado del código genético para la secuencia del ácido nucleico de SEQ ID No. 1 o el complemento de esta.
 - (g) una secuencia que codifica para un polipéptido que tiene actividad de xilanasa, que es:
 - (1) la secuencia codificante a partir de los nucleótidos 69 a 1224 de SEQ ID No. 1 o
 - (2) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a una secuencia definida en (1); o
 - (h) una secuencia complementaria a un polinucleótido definido en (g).
7. Una secuencia de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el fragmento en (c) tiene al menos 200 bases de longitud o la identidad en (d) tiene al menos 98% o el número de nucleótidos modificados en (e) es hasta 50.
8. Un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, que es una secuencia de ADN.

9. Un vector que comprende una secuencia de polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. Un vector de acuerdo con la reivindicación 9, que es un vector de expresión, tal como donde una secuencia de ADN de acuerdo con la reivindicación 8, se liga operativamente a una secuencia reguladora.
- 5 11. Una célula huésped, que comprende, como una secuencia heteróloga, un polinucleótido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
12. Una célula huésped, que expresa, como una proteína heteróloga, un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
13. Una célula huésped transformada con un vector de la reivindicación 9.
- 10 14. Un proceso de producción de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el proceso que comprende el cultivo de una célula huésped, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13 bajo condiciones que proveen la expresión del polipéptido.
15. Una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 15 16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, que además comprende un polipéptido que tiene actividad de celulasa, endo-arabinanasa, ramnogalacturonasa o poligalacturonasa.
17. Un método de tratamiento de una planta o material que contiene xilano, el método que comprende poner en contacto el material con una proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16.
- 20 18. Un método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el tratamiento comprende la degradación, la hidrólisis o modificación del xilano en el material o la degradación o modificación de las paredes de las células vegetales.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 17 o 18, en donde el tratamiento comprende la escisión de las subunidades de xilopiranosilo o p-D-xilano y/o el material comprende una planta, pulpa vegetal, extracto de planta o un alimento comestible o ingrediente para este.
- 25 20. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, que reduce la viscosidad del material, degrada o hidroliza el xilano contenido en el material o mejora la claridad o capacidad de filtración del material.
- 30 21. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición de acuerdo con la reivindicación 15 o la reivindicación 16 en un método de tratamiento del material vegetal, que mejora la capacidad de filtración y/o que reduce la viscosidad de los líquidos que contienen xilano, que mejora la capacidad de filtración o que clarifica los líquidos alcohólicos como la cerveza y el vino o jugos de frutas o vegetales, la hidrólisis de residuos agrícolas, en el reciclaje de materiales como que contienen papel en la fabricación de papel para el espesamiento de productos alimenticios y/o la extracción de materiales deseables como café, aceites vegetales o almidón, procesamiento de pulpa, jugo o extractos de plantas, que mejoran el volumen del pan, la calidad del pan o que reduce la pegajosidad de la masa.
- 35 22. Un pienso, de preferencia pienso para animal, alimento o producto alimenticio que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 40 23. El uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la elaboración de la cerveza, cerveza o fabricación del vino, destilación, reciclaje, biometanación, higiene dental, tratamiento del cuero, fabricación del papel, tratamiento de extractos o jugos vegetales o frutas, tratamiento o manufactura de textiles, fabricación de pan u horneado, tratamiento de bulbos de flores, preparación de alimentos o productos alimenticios o en un pienso para animales.
24. Un alimento o producto alimenticio de acuerdo con la reivindicación 22, que es una bebida alcohólica, pan, masa o té.
25. Un organismo de planta transgénica o parte de esta, que comprende una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13.