

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 917**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C09K 8/68 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010 E 14182754 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.03.2016 EP 2857490**

54 Título: **Nuevas variantes de mananasa**

30 Prioridad:

13.01.2010 US 294684 P

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

04.07.2016

73 Titular/es:

**BASF SE (100.0%)
Carl-Bosch-Strasse 38
67056 Ludwigshafen am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

KENSCH, OLIVER

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 575 917 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

Nuevas variantes de mananasa

Campo de la divulgación

5 La tecnología que se proporciona en el presente documento se relaciona con variantes mejoradas de mananasas microbianas más específicamente a enzimas microbianas que presentan actividad mananasa como su actividad enzimática principal; a moléculas de ácido nucleico que codifican dichas mananasas; composiciones que comprenden dichas mananasas, vectores, células huésped que contienen los ácidos nucleicos y procedimientos para la preparación y producción de dichas enzimas; y a procedimientos para utilizar dichas enzimas en el procesamiento de alimentos y piensos, para su extracción a partir del café y el procesamiento del residuo de café, como un suplemento de alimentos y piensos, para el blanqueamiento de pastas de papel asistido por enzimas, como agente blanqueador o de desapesto en la industria textil, para la estimulación de pozos petrolíferos y de gas por fractura hidráulica, como detergente, como ingredientes de panadería, para retirar biopelículas y en sistemas de suministro, para el procesamiento de granos o para el procesamiento de fuentes renovables que se pretenden para la producción de combustibles biológicos, y en las industrias textil, perforadora de petróleo, de limpieza, de lavandería, de detergentes, y de procesamiento de fibra de celulosa.

Antecedentes

20 La endo- β -1,4-D-mananasa (β -mananasa; EC 3.2.1.78) cataliza la hidrólisis aleatoria de los enlaces manoglucosídicos de los polisacáridos basados en manano. La mayoría de las β -mananasas degradan oligosacáridos por debajo de DP4 (Biely y Tenkanen (1998) *Enzymology of hemicellulose degradation*, páginas 25-47). En Harman y Kubicek (ed) *Trichoderma and Gliocladium*, vol.2, Taylor y Francis Ltd. London, sin embargo, se ha demostrado una actividad residual sobre la manotriosa, que indica al menos cuatro subsitios para la unión de manosa en la proteína. Los principales productos finales de la hidrólisis a menudo son manobiosa y manotriosa, aunque también se producen cantidades significativas de manosa. Algunas β -mananasas son capaces de degradar el manano cristalino. Además de la hidrólisis, varias β -mananasas incluida la β -mananasa de *Trichoderma reesei*, han demostrado que forman productos de transglucosilación con manosa o manobiosa comoceptoras en el enlace glucosídico.

30 Las β -mananasas se han aislado de un amplio intervalo de organismos que incluye bacterias, hongos, plantas y animales. Aunque mayoritariamente son extracelulares, algunas β -mananasas parecen estar asociadas a células. Su expresión a menudo está inducida por el cultivo en manano o galactomanano, sin embargo, la β -mananasa de *T. reesei* también se puede inducir en celulosa, aunque su expresión la suprimen la glucosa y otros monosacáridos. Frecuentemente, se encuentran múltiples mananasas con diferentes puntos isoelectrónicos en el mismo organismo, que representan productos de diferentes genes o productos diferentes del mismo gen, respectivamente.

35 En general, las β -mananasas tienen una temperatura óptima moderada entre 40° C y 70° C, excepto algunas β -mananasas de termófilos (Politz y col. (2000) *A highly thermostable endo-1,4- β -mannanase from the marine bacterium Rhodothermus marinus*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:715-721). El pH óptimo está en la región neutra o ácida, por ejemplo un pH 5,0 para la β -mananasa de *T. reesei* (Arisan-Atac y col. (1993) *Purification and characterisation of a β -mannanase of Trichoderma reesei C-30*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:58-62). Los pesos moleculares de las enzimas varían entre 30 kD y 80 kD.

40 El documento WO 2008009673 desvela variantes de mananasas de *Trichoderma reesei* mejoradas en cuanto a su estabilidad térmica y con resistencia a pH bajo/pepsina para su uso en la hidrólisis de material vegetal que contiene galactomanano, por ejemplo, torta de presión de palmiste (PKE) y para su uso en piensos para animales. Por ejemplo, se necesita termoestabilidad en los aditivos del pienso que se incorporan en las mezclas de pienso antes de un procedimiento de aglomerado que comprende altas temperaturas. Adicionalmente, las mananasas que se aplican como aditivos en piensos necesitan ser estables a pH bajo y a la pepsina y tienen que ser activas a pH bajo con el fin de ser capaces de trabajar eficazmente en el estómago de por ejemplo, los animales monogástricos.

50 Sin embargo, la tendencia en la industria de piensos es aumentar las temperaturas de aglomerado más y más. Actualmente, la estabilidad de las enzimas se dirige a temperaturas de aglomerado de alrededor de 90° C a 95° C para hacer posible el uso de enzimas a lo largo de todas las plantas de producción de piensos industrialmente relevantes. Por lo tanto, la disponibilidad de una mananasa con una estabilidad térmica mejorada sería altamente ventajosa, ya que permitiría la utilización de la enzima también en plantas con una alta temperatura de trabajo.

Sumario de la divulgación

55 En un primer aspecto, las realizaciones de la divulgación proporcionan una variante de mananasa que tiene actividad mananasa y una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia de aminoácidos de la mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en la que la secuencia de aminoácidos de la variante de mananasa comprende las variaciones 201 S, 207F y 274L, y las variaciones 66P, 215T y 259R y una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la Seq ID 1.

ES 2 575 917 T3

En un segundo aspecto, las realizaciones de la presente divulgación se refieren a una variante de mananasa que tiene una actividad mananasa y una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia de aminoácidos de la mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en la que la secuencia de aminoácidos de la variante de mananasa comprende las variaciones 201S, 207F y 274L, y al menos variaciones que se seleccionan de entre el grupo que consiste en:

5

1) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N331S

2) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S

3) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D

4) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S

10

5) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D

6) F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L

7) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R

8) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S

9) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R

15

10) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D

11) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D/N331S

12) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L

13) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D

14) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D

20

15) S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R

16) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D

17) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D

18) F31Y/S66P/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D

19) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L

25

20) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D

21) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D

22) F31Y/S66P/Q97R/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D

23) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D

24) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D

30

25) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S

26) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D

27) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N331S

28) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N331S

29) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S

35

30) S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181A/A215T/Q259R

31) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S

32) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R

33) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S

- 34) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L
- 35) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L
- 36) F31Y/S66P/Q97R/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 37) S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 5 38) F31Y/S66P/Q97R/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 39) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 40) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 41) S66P/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 42) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N331S
- 10 43) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 44) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 45) S66P/V181H/A215T/Q259R
- 46) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 47) F31Y/S66P/N173T/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 15 48) F31Y/S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N344D
- 49) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 50) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
- 51) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S
- 52) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R
- 20 53) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S
- 54) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D
- 55) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 56) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R
- 57) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S
- 25 58) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
- 59) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 60) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 61) F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 62) S66P/A215T/Q259R

30 y una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la Seq ID.

En otro aspecto más, las realizaciones de la presente divulgación proporcionan ácidos nucleicos que codifican las variantes de mananasa que se desvelan en el presente documento, así como vectores y células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos. En otras realizaciones más, las secuencias se emplean en procesos que dan como resultado las variantes de mananasa.

35 Además, las realizaciones de la presente divulgación se refieren en general al uso de las variantes de mananasa para la digestión de galactomanano, en particular catalizando la hidrólisis aleatoria de enlaces mano-glucosídicos en los polisacáridos basados en manano. Ventajosamente, las variantes de mananasa de la presente divulgación se pueden utilizar en aplicaciones industriales que incluyen, por ejemplo, procedimientos para licuefacción del almidón y para aumentar la digestión de galactomanano en alimentos y piensos para animales. Ventajosamente, las
 40 variantes de mananasa de acuerdo con las realizaciones de la presente divulgación son útiles y se utilizan en procesos y/o productos de fermentación alcohólica, para la extracción a partir del café y el procesamiento del

residuo del café, como un suplemento para los alimentos y piensos, para el blanqueamiento de las pastas de papel asistido por enzimas, y como agentes blanqueadores y/o de desapesto en la industria textil, para la estimulación de pozos petroleros y de gas por fractura hidráulica, como detergentes, como ingredientes de panadería, para retirar biopelículas y en sistemas de suministro, para el procesamiento de granos o para el procesamiento de fuentes renovables que se pretenden para la producción de combustibles biológicos, y en las industrias textil, de perforación petrolera, de limpieza, de lavandería, de detergentes, y de procesamiento de fibra de celulosa.

En otros aspectos, la divulgación se refiere a composiciones enzimáticas que comprenden una variante de mananasa como se describe en el presente documento, en el que la composición de la enzima es útil para, o se utiliza en, aplicaciones comerciales. En una realización, la composición enzimática puede ser una composición de pienso para animales. En otras realizaciones, la composición enzimática se puede utilizar en procesos de hidrólisis del almidón (por ejemplo, licuefacción). En una realización ventajosa, las variantes y/o la composición enzimática se pueden utilizar en procesos de fermentación alcohólica. En realizaciones adicionales, una composición enzimática que comprende una mananasa englobada en la presente divulgación incluirá enzimas adicionales, tales como fitasas, glucoamilasas, alfa-amilasas, proteasas, celulasas, hemicelulasas y combinaciones de las mismas.

En un aspecto adicional, las realizaciones de la presente divulgación se refieren a procedimientos para producir las variantes de mananasa en una célula huésped transformando la célula huésped con una construcción de ADN, que incluye ventajosamente un promotor que tiene actividad de transcripción en la célula huésped, cultivando la célula huésped transformada en un medio de cultivo adecuado para permitir la expresión de dicha mananasa y produciendo la mananasa. El procedimiento puede incluir también recuperar la mananasa producida. En una realización, la célula huésped es un hongo tipo *Trichoderma*, tal como *T. reesei*, una levadura, una célula bacteriana o vegetal. En una realización ventajosa de la presente divulgación, la variante de mananasa tiene la secuencia de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o variantes, formas modificadas, homólogas, proteínas de fusión, equivalentes funcionales o fragmentos de la misma.

Antes de que la divulgación se describa en detalle, se tiene que entender que esta divulgación no se limita a las partes particulares que componen los dispositivos descritos o las etapas de procesamiento de los procedimientos descritos ya que dichos dispositivos y procedimientos pueden variar. También se tiene que entender que la terminología que se utiliza en el presente documento tiene solamente el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sean limitantes. Se debe señalar que, como se utiliza en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el” incluye el singular y/o las referencias en plural a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. Se tiene que entender además que, en el caso de intervalos de parámetros que se dan delimitados por valores numéricos, se considera que los intervalos incluyen estos valores de los límites.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra una secuencia de aminoácidos de una mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre, (SEQ ID NO: 1).

La FIG. 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante V-31 de mananasa de *Trichoderma reesei* desvelada en el documento WO 2008/009673 (SEQ ID NO: 2).

La FIG. 3 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante V-31/S3R de mananasa de *Trichoderma reesei* adicional desvelada en el documento WO 2008/009673 (SEQ ID NO: 3).

La FIG. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de una ventajosa variante TM-1 de mananasa de acuerdo con la presente divulgación.

La FIG. 5 muestra la secuencia de ácido nucleico de la variante TM-1 de mananasa (SEQ ID NO: 4) de acuerdo con la presente divulgación (SEQ ID NO: 5).

La FIG. 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante TM-100 de mananasa más ventajosa de acuerdo con la presente divulgación (SEQ ID NO: 6).

La FIG. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante TM-108 de mananasa más ventajosa de la presente divulgación (SEQ ID NO: 7).

La FIG. 8 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante TM-CBD-148 de mananasa más ventajosa de acuerdo con la presente divulgación (SEQ ID NO: 8).

La FIG. 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una variante TM-144 de mananasa más ventajosa de acuerdo con la presente divulgación (SEQ ID NO: 9).

La FIG. 10 muestra la comparación de la mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre y la variante S3R con respecto a la estabilidad térmica y la actividad.

La FIG. 11 muestra la secuencia de aminoácidos de un Dominio de Unión a la Celulosa (CBD).

Descripción detallada de la presente divulgación

5 Se desvelan en el presente documento variantes de mananasas de *Trichoderma reesei* (EC 3.2.1.78) y ácidos nucleicos que codifican las mananasas que se pueden utilizar en aplicaciones industriales que incluyen procedimientos para la hidrólisis proteica, degradación de biomasa y para aumentar la digestión del galactomanano contenido en los alimentos y/o los piensos para animales.

10 En particular, las variantes de mananasa de acuerdo con la presente divulgación muestran una estabilidad térmica mejorada, estabilidad al pH/pepsina y al mismo tiempo actividades específicas mejoradas o que se mantienen en comparación con la enzima mananasa parental que se utiliza. Estas características las hacen específicamente útiles para una aplicación industrial en piensos para animales, alimentos y para la degradación del galactomanano en material vegetal en general.

La presente divulgación revela enzimas que tienen actividad mananasa con una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia de aminoácidos de la mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en la que la secuencia de aminoácidos de la variante de mananasa comprende las variaciones 201S, 207F, y 274L, y las variaciones 66P, 215T, y 259R y una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la Seq ID 1.

15 En realizaciones ventajosas adicionales, las variantes de mananasa de acuerdo con la presente divulgación comprenden además de las variaciones 201 S, 207F, 274L y 66P, 215T, 259R una variación en la posición 3 y/o 181 que se corresponden con la posición de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la variación en la posición 3 es 3R, la variación en la posición 181 es 181A o 181H (181/A/H).

20 En una realización adicional, las variantes de mananasa comprenden además de las variaciones 201 S, 207F, 274L y 66P, 215T, 259R una variación 181 A/H en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En una realización ventajosa, las variantes de mananasa comprenden además una variación 3R.

25 En una realización ventajosa, la secuencia de aminoácidos de las variantes de mananasa de acuerdo con la presente divulgación comprenden la variación 201S, 207F, 274L y 66P, 215T, 259R y una o más variaciones adicionales, en las que la posición de variación es 31, 97, 113, 146, 149, 173, 181, 280, 282, 331 o 344 en comparación con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, las variaciones son 31Y, 97R, 113Y, 146Q, 149K, 173H/T, 181H/A, 280S/L/R, 282D, 331S o 344D.

30 Son realizaciones ventajosas de la divulgación variantes de mananasa que tienen al menos un porcentaje de identidad de secuencia mínimo con las mananasas de acuerdo con la presente divulgación, en las que el porcentaje de identidad mínimo es al menos del 93 %, al menos del 96 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %.

35 Un segundo aspecto de la presente invención son variantes de mananasa adicionales que tienen actividad mananasa y una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia de aminoácidos de la mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en las que la secuencia de aminoácidos de la variante de mananasa comprende las variaciones 201 S, 207F y 274L, y al menos variaciones que se seleccionan de entre el grupo que consiste en:

1) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N331S

2) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S

3) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D

4) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S

40 5) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D

6) F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L

7) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R

8) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S

9) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R

45 10) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D

11) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D/N33 1S

12) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L

13) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D

ES 2 575 917 T3

- 14) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 15) S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R
- 16) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D
- 17) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D
- 5 18) F31Y/S66P/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 19) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L
- 20) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 21) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 22) F31Y/S66P/Q97R/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 10 23) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D
- 24) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D
- 25) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
- 26) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D
- 27) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N331S
- 15 28) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N33 1S
- 29) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
- 30) S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181A/A215T/Q259R
- 31) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 32) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R
- 20 33) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S
- 34) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L
- 35) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L
- 36) F31Y/S66P/Q97R/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 37) S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 25 38) F31Y/S66P/Q97R/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 39) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 40) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 41) S66P/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 42) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N331S
- 30 43) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 44) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 45) S66P/V181H/A215T/Q259R
- 46) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 47) F31Y/S66P/N173T/V181H/A215T/Q259R/N282D
- 35 48) F31Y/S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N344D
- 49) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 50) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S

- 51) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S
- 52) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R
- 53) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S
- 54) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D
- 5 55) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
- 56) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R
- 57) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S
- 58) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
- 59) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 10 60) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 61) F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
- 62) S66P/A215T/ Q259R

y que tienen una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la Seq ID 1.

15 Las realizaciones de la presente divulgación también incluyen variantes de cualquiera de las mananasa que se exponen en las secuencias 1) a 62), que tienen actividad mananasa y una secuencia de aminoácidos que tiene un porcentaje de identidad de secuencia y/o un porcentaje de homología de al menos el 93 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, en comparación con cada una de las variantes de mananasa que se exponen en las secuencias 1) a 62).

20 Realizaciones adicionales de la divulgación son moléculas de ácido nucleico, que se seleccionan de entre el grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que codifica las variantes de mananasa de acuerdo con la presente divulgación.

Realizaciones adicionales de la divulgación son vectores y células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de mananasa de acuerdo con la presente divulgación.

25 Además, las realizaciones son procedimientos para preparar las variantes de mananasa de acuerdo con la divulgación, que comprenden cultivar la célula huésped transformada y aislar la mananasa modificada del cultivo.

30 A menos que se defina otra cosa en el presente documento, todos los términos científicos y técnicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habituado en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Singleton, y col., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley y Sons, New York (1994), y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente divulgación.

35 La presente divulgación no está limitada por los procedimientos y materiales ejemplares que se desvelan en el presente documento, y se puede utilizar cualquiera de los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica o los ensayos de las realizaciones de la presente divulgación. Los intervalos numéricos son con los números que definen el intervalo inclusive. A menos de que se indique otra cosa, las secuencias de ácido nucleico se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxilo, respectivamente.

40 Las referencias que se proporcionan en el presente documento no son limitaciones de varios aspectos o realizaciones de la presente divulgación que se pueden tener por referencia para la memoria descriptiva como un todo. En consecuencia, los términos definidos inmediatamente después se definen más completamente por referencia para la memoria descriptiva como un todo.

45 En una realización de la presente divulgación, las enzimas mananasa muestran una estabilidad térmica particularmente mejorada y al mismo tiempo actividades específicas mejoradas o que se mantienen en comparación con las mananasa que se desvelan en el documento WO 2008/009673. Estas características las hacen especialmente útiles para una aplicación industrial en piensos para animales, alimentos y para la degradación de galactomanano en material vegetal en general.

Por lo tanto, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para la producción de mananasa en *Trichoderma reesei*, que sean activas a valores de pH bajos como los que están presentes en el estómago e

intestino superior de los animales, y en el buche, estómago e intestino superior de las aves de granja. Es otro objetivo más de la presente divulgación proporcionar una mananasa que se pueda añadir a un pienso para animales antes del aglomerado, con el fin de permitir una dosificación precisa y reproducible de enzima, y evitar una etapa adicional de pulverización en la preparación del pienso.

5 El término “mananasa” se refiere a cualquier enzima capaz de hidrolizar las cadenas poliosa que están compuestas por unidades de manosa (manopolímeros y polimanasas). Por lo tanto “mananasa” comprende tanto las endomanasas como las exomanasas que escinden manopolímeros internamente o a partir de los extremos del polímero, respectivamente.

10 La expresión “equivalente funcional de una mananasa” o “equivalente funcional de la misma” significa que la enzima tiene que tener aproximadamente las mismas características funcionales de la mananasa de *Trichoderma reesei*.

La expresión “forma modificada” o “variante” significa que la enzima se ha modificado a partir de su forma original (parental/ de tipo silvestre, wt) pero mantiene las mismas características enzimáticas funcionales que las de la mananasa de *Trichoderma reesei*.

15 La expresión “proteínas de fusión” comprende todas las proteínas que se derivan de la mananasa parental o cualquier variante de la misma por fusión covalentemente con secuencias de aminoácidos adicionales en el extremo C y/o N. La fuente y composición de la secuencia de aminoácidos adicional es natural a partir de cualquier organismo vivo o virus, o no natural.

20 La expresión “fragmento funcional” o “fragmento eficaz” significa un fragmento o parte de la mananasa de *Trichoderma reesei* o un derivado de la misma que mantiene aproximadamente la misma función enzimática o efecto. La expresión “mananasa homóloga” de acuerdo con la presente divulgación comprende cualquier enzima que tiene una identidad de secuencia de al menos el 70 % o preferentemente al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 % o 99 % con la mananasa parental.

25 El término “polinucleótido” se corresponde con cualquier material genético de cualquier longitud y cualquier secuencia, que comprende moléculas de ADN y ARN de cadena simple y cadena doble, incluyendo elementos reguladores, genes estructurales, grupos de genes, plásmidos, genomas enteros y fragmentos de los mismos.

El término “posición” en un polinucleótido o polipéptido se refiere a las bases o aminoácidos únicos específicos en la secuencia del polinucleótido o polipéptido, respectivamente.

30 El término “polipéptido” comprende proteínas tales como enzimas, anticuerpos y similares, polipéptidos de longitud media tales como inhibidores peptídicos, citocinas y similares, así como péptidos cortos inferiores con una longitud de secuencia de aminoácidos por debajo de 10, tales como ligandos peptídicos de receptor, hormonas peptídicas, y similares.

35 La expresión “variantes de mananasa” significa cualquier molécula de mananasa que se obtiene por mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, inserción, eliminación, recombinación y/o cualquier otro procedimiento de modificación proteica, que dé lugar a manasas que son diferentes en su secuencia de aminoácidos a la mananasa parental. Las expresiones “mananasa de tipo silvestre”, “enzima de tipo silvestre”, o “tipo silvestre” de acuerdo con la divulgación describe una enzima mananasa con una secuencia de aminoácidos que se encuentra en la naturaleza o un fragmento de la misma.

40 La “mananasa parental” puede ser una mananasa de tipo silvestre aislada o un fragmento de la misma, o una o más de las variantes de mananasa que se seleccionan de entre una biblioteca de manasas. La expresión “biblioteca de manasas” describe al menos una variante de mananasa o una mezcla de manasas en la que cada mananasa única, con respecto a cada variante de mananasa, está codificada por una secuencia de polinucleótido diferente.

La expresión “biblioteca genética” indica una biblioteca de polinucleótidos que codifican la biblioteca de manasas.

El término “aislada” describe cualquier molécula separada de su fuente natural.

45 El término “mutación” se refiere a la sustitución o remplazo de tripletes de nucleótidos únicos o múltiples, inserciones o eliminaciones de uno o más codones, recombinación homóloga o heteróloga entre diferentes genes, fusión de secuencias codificantes adicionales en cualquiera de los extremos de la secuencia codificante, o la inserción de secuencias codificantes adicionales o cualquier combinación de estos procedimientos, que da como resultado una secuencia de ácido polinucleico que codifica la proteína deseada. Por lo tanto, el término “mutaciones” también se refiere a todos los cambios en la secuencia de polipéptido que está codificada por la secuencia de ácido polinucleico modificado por uno o más de los cambios que se han descrito anteriormente. Los restos de aminoácidos se abrevian de acuerdo con la Tabla 1 posterior con un código de una o tres letras.

50 Se pretende que la expresión “molécula de ácido nucleico” o “ácido nucleico” indique cualquier molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble de ADNc, ADN genómico, ADN o ARN sintético, de origen PNAS o LNA.

La expresión “condiciones rigurosas” se refiere a las condiciones en las que se hibrida una sonda con su

5 subsecuencia diana pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente de 5° C menos que el punto de fusión térmica (Tm) para la secuencia específica con una fuerza iónica y pH determinados. El Tm es la temperatura (de un ácido nucleico con una fuerza iónica, pH y concentración determinadas) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. (Como las secuencias diana en general están presentes en exceso, en el Tm, el 50 % de las sondas se ocupan en equilibrio). Típicamente, las condiciones rigurosas serán en las que la concentración de sales es menor de aproximadamente 1,0 M de ion Na, típicamente aproximadamente de 0,01 a 1,0 M de ion Na (u otras sales) a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es al menos aproximadamente de 30° C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y al menos aproximadamente de 60° C para sondas más largas. Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida y similares.

15 Se pretende que la expresión “fragmento de la molécula de ácido nucleico” indique un ácido nucleico que comprende un subgrupo de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas. Lo mismo se aplica a la expresión “fracción de la molécula de ácido nucleico”.

La expresión “variante de la molécula de ácido nucleico” se refiere en el presente documento a una molécula de ácido nucleico que es similar sustancialmente en estructura y actividad biológica a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas.

20 La expresión “homóloga de la molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico cuya secuencia tiene uno o más nucleótidos añadidos, eliminados, sustituidos o modificados químicamente de otra manera en comparación con una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas, siempre y cuando la homóloga mantenga sustancialmente las mismas propiedades de unión que la última.

25 El término “derivada”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene características de unión a una secuencia de ácido nucleico diana similares que una molécula de ácido nucleico de acuerdo con una de las secuencias reivindicadas.

Tabla 1: Abreviaturas de aminoácidos

| Abreviaturas | Aminoácido |
|--------------|---------------------|
| A | Ala Alanina |
| C | Cys Cisteína |
| D | Asp Ácido Aspártico |
| E | Glu Ácido Glutámico |
| F | Phe Fenilalanina |
| G | Gly Glicina |
| H | His Histidina |
| I | Ile Isoleucina |
| K | Lys Lisina |
| L | Leu Leucina |
| M | Met Metionina |
| N | Asn Asparagina |
| P | Pro Prolina |
| Q | Gln Glutamina |
| R | Arg Arginina |
| S | Ser Serina |
| T | Thr Treonina |
| V | Val Valina |
| W | Trp Triptófano |
| Y | Tyr Tirosina |

30 Las mutaciones o variaciones se describen por el uso de la siguiente nomenclatura: posición; resto(s) de aminoácido sustituto(s). De acuerdo con esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un resto de alanina por un resto de glicina en la posición 20 se indica como 20G. Cuando el resto de aminoácido en una posición determinada se sustituye con dos o más restos de aminoácido alternativos estos restos se separan por una coma o una barra. Por ejemplo, la sustitución de alanina en la posición 30 con glicina o ácido glutámico se indica como 20G/E, o 20G, 20E.

35 Además, también se podría utilizar la siguiente nomenclatura: resto de aminoácido en el armazón proteico; posición; resto(s) de aminoácido sustituto(s). De acuerdo con esta nomenclatura, la sustitución de, por ejemplo, un resto de

alanina por un resto de glicina en la posición 20 se indica como Ala20Gly o A20G, o 20G. La eliminación de alanina en la misma posición se muestra como Ala20* o A20*. La inserción de un resto de aminoácido adicional (por ejemplo, una glicina) se indica como Ala20AlaGly o A20AG. La eliminación de un tramo de restos de aminoácidos consecutivos (por ejemplo, entre la alanina de la posición 20 y la glicina en la posición 21) se indica como Δ (Ala20-Gly21) o Δ (A20-G21). Cuando una secuencia contiene una eliminación en comparación con la proteína parental que se utiliza para la numeración, una inserción en dicha posición (por ejemplo, una alanina en la posición eliminada 20) se indica como *20Ala o *20A. Las mutaciones múltiples se separan con un signo de suma o una barra. Por ejemplo, dos mutaciones en las posiciones 20 y 21 que sustituyen la alanina y el ácido glutámico por glicina y serina, respectivamente, se indican como A20G+E21S o A20G/E21S. Cuando un resto de aminoácido en una posición determinada se sustituye con dos o más restos de aminoácidos alternativos, estos restos se separan por una coma o una barra. Por ejemplo, la sustitución de alanina en la posición 30 con glicina o ácido glutámico se indica como A20G,E o A20G/E, o A20G, A20E. Cuando se identifica en el presente documento una posición adecuada para una modificación sin que se haya sugerido una modificación específica, se tiene que entender que se puede sustituir cualquier resto de aminoácido por el resto de aminoácido presente en la posición. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 20 pero no se especifica, se tiene que entender que la alanina se puede eliminar o sustituir por cualquier otro resto de aminoácido (es decir, uno cualquiera de R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y y V).

Las expresiones “mutación conservadora”, o “sustitución conservadora”, respectivamente, se refieren a una mutación de un aminoácido que un experto en la técnica considera conservadora respecto a una primera mutación. “Conservadora” en este contexto significa un aminoácido similar en términos de características de aminoácido. Si, por ejemplo, una mutación da lugar a la sustitución en una posición específica de un resto de aminoácido no alifático (por ejemplo, Ser) con un resto de aminoácido alifático (por ejemplo, Leu) entonces, se hace referencia a una sustitución en la misma posición con un aminoácido alifático diferente (por ejemplo, Ile o Val) como una mutación conservadora. Las características de aminoácido adicionales incluyen el tamaño del resto, la hidrofobia, polaridad, carga, valor de pK, y otras características de aminoácido que se conocen en la técnica. En consecuencia, una mutación conservadora puede incluir la sustitución tal como de básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. Los grupos de aminoácidos que se derivan de esta manera probablemente se conservarán por razones estructurales. Estos grupos se pueden describir en forma de un diagrama de Venn (Livingstone C.D. y Barton G.J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" Comput.Appl Biosci. 9: 745-756; Taylor W.R. (1986) "The classification of amino acid conservation" J.Theor.Biol. 119; 205-218). Se pueden hacer sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la tabla posterior que describe un agrupamiento de aminoácidos según el diagrama de Venn generalmente aceptado.

Tabla 2: Agrupamiento de aminoácidos según diagrama de Venn

| Grupo | Sub-grupo | | |
|-----------|-------------------------|-----------------------|-----------|
| Hidrófobo | F W Y H K M I L V A G C | Aromático | F W Y H |
| | | Alifático | I L V |
| Polar | W Y H K R E D C S T N Q | Cargado | H K R E D |
| | | Cargado positivamente | H K R |
| | | Cargado negativamente | E D |
| Pequeño | V C A G S P T N D | Diminuto | A G S |

La expresión “actividad catalítica” o “actividad” describe cuantitativamente la conversión de un sustrato determinado en unas condiciones de reacción determinadas. La expresión “actividad residual” se define como la relación de la actividad catalítica de la enzima en un cierto ajuste de las condiciones respecto a la actividad catalítica en un ajuste diferente de las condiciones. Por lo tanto, la actividad residual a_i se determina por $a_i = v_i/v_0$ en el que v señala cualquier medición de la actividad catalítica y $a_i * 100$ es la actividad relativa en porcentaje. La expresión “actividad específica” describe cuantitativamente la actividad catalítica por cantidad de enzima en determinadas condiciones de reacción.

El término “termoestabilidad”, “estabilidad a la temperatura” o “estabilidad térmica” describe la propiedad de una proteína para resistir una exposición al calor limitada sin perder su actividad a temperaturas más bajas, por ejemplo, a la temperatura a la que se puede medir su actividad.

La expresión “estabilidad en pH” describe la propiedad de una proteína para resistir una exposición limitada a valores de pH que se desvían significativamente del pH en la que su estabilidad es óptima, por ejemplo, más de una unidad de pH por encima o debajo del pH óptimo, sin perder su actividad en condiciones en las que se puede medir su actividad.

La expresión “estabilidad proteolítica” describe la propiedad de una proteína para resistir una exposición limitada a las proteasas en condiciones en las que las proteasas son activas, sin perder la actividad en condiciones en las que se puede medir su actividad.

El término “plásmido”, “sistema de vector” o “vector de expresión” significa una construcción capaz de expresarse *in vivo* o *in vitro*. En el contexto de la presente divulgación, estas construcciones se pueden utilizar para introducir genes que codifican las enzimas en células huésped.

5 La expresión “célula huésped” en relación con la presente divulgación incluye cualquier célula que comprende la molécula de ácido nucleico o un vector de expresión como se ha descrito anteriormente y la cual se utiliza en la producción recombinante de una enzima que tiene las propiedades específicas que se definen en el presente documento o en los procedimientos de la presente divulgación.

10 La “temperatura de inactivación” se define como la temperatura a la cual la actividad residual de una enzima mananasa tras la incubación durante una cierta duración y posterior enfriamiento a temperatura ambiente es del 50 % de la actividad residual de la misma enzima mananasa que se incubó durante la misma duración en las mismas condiciones a temperatura ambiente.

15 La expresión “recursos renovables” se refiere a sustratos de biomasa que se cultivan y recolectan, tal como granos, paja, madera y productos de madera. La expresión “combustibles biológicos” se refiere a un combustible sólido, líquido o gaseoso que consiste en, o se deriva de biomasa, como el biocombustible, biogás, combustible vegetal, Bioetanol, BioHidrógeno, Bio-dimetil éter, Biometanol, combustible BTL (“Biomasa a líquido”), combustible GTL (“Gas a líquido”), y similares.

20 La expresión “equivalente funcional de la misma” significa que la enzima tiene que tener aproximadamente las mismas características funcionales que las de la mananasa de *Trichoderma reesei*. La expresión “forma modificada” o “variante” significa que la enzima se ha modificado desde su forma original pero que mantiene las mismas características funcionales enzimáticas que las de la mananasa de *Trichoderma reesei*. En particular, las expresiones “variante” o “forma modificada” engloba las enzimas mananasa con una secuencia de aminoácidos que se deriva de la secuencia de aminoácidos de la mananasa parental/de tipo silvestre y que tienen una o más sustituciones, inserciones, eliminaciones de aminoácidos o cualquier combinación de las mismas, a las que se hace referencia en conjunto como mutaciones.

25 Las “proteínas de fusión” comprenden todas las proteínas derivadas de la mananasa parental o cualquier variante de la misma por fusión de manera covalente con una secuencia de aminoácidos adicional en el extremo C y/o N de la mananasa parental.

30 El “porcentaje de identidad de secuencia”, con respecto a dos secuencias de aminoácidos o de polinucleótido, se refiere al porcentaje de restos que son idénticos en las dos secuencias cuando las secuencias se alinean óptimamente. Por lo tanto, un 80 % de identidad de secuencia significa que el 80 % de los aminoácidos en dos secuencias polipeptídicas alineadas óptimamente son idénticos. El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, por comparación directa de la información de secuencia entre dos moléculas alineando las secuencias, contando el número exacto de coincidencias entre las dos secuencias alineadas, dividiendo por la longitud de la secuencia más corta, y multiplicando el resultado por 100. Se pueden utilizar programas de computadora fácilmente disponibles para ayudar al análisis, tales como ALIGN, Dayhoff, M.O. en "Atlas of Protein Sequence and Structure", M.O. Dayhoff et., Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, DC, que adapta el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Advances in Appl. Math.* 2:482-489 al análisis de péptidos. Los programas para determinar la identidad de secuencias de nucleótidos están disponibles en el Paquete de Análisis de Secuencias Wisconsin, Versión 8 (disponible en Genetics Computer Group, Madison, WI) por ejemplo, los programas BESTFIT, FASTA y GAP, que también se basan en el algoritmo de Smith y Waterman. Estos programas se utilizan fácilmente con los parámetros por defecto 5 que recomienda el fabricante y que se describen en el Paquete de Análisis de Secuencias Wisconsin al que se hizo referencia anteriormente. Un ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul, y col., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990). El software para llevar a cabo los análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Al igual, también están disponibles fácilmente programas de computadora para determinar el porcentaje de homología.

Un “pienso” y un “alimento”, respectivamente, significan cualquier dieta natural o artificial, comida o similar o componentes de dichas comidas que se pretenden o sean adecuadas para ser comidas, ingeridas, digeridas, por un animal y un ser humano, respectivamente.

50 Un “aditivo de un alimento o de un pienso” es un compuesto o una composición multicomponente que se pretende o es adecuado para añadirse a un alimento o pienso. Puede comprender, pero no es necesario, uno o más compuestos tales como vitaminas, minerales o enzimas que mejoran el pienso y vehículos y/o excipientes adecuados, y se proporcionan habitualmente en una forma que es adecuada para que se añada a un pienso para animales.

55 Las formas modificadas o variantes pueden presentar características enzimáticas alteradas en comparación con la enzima parental. Preferentemente, las formas modificadas o variantes tienen uno o más de los siguientes fenotipos mejorados: aumento de termoestabilidad; y/o una estabilidad proteolítica aumentada (por ejemplo contra la pepsina); y/o un aumento de la actividad específica y/o estabilidad mejorada a pH bajo. El término fragmento “funcional” o

“eficaz” significa un fragmento o parte de la mananasa de *Trichoderma reesei* que mantiene aproximadamente la misma función enzimática o efecto. Se entiende también que la presente divulgación comprende todas las moléculas que se derivan de la mananasa parental y todas las variantes de la misma que se describen en la presente solicitud, por procesamiento post-traducciona en comparación con la secuencia de aminoácidos que se codifica genéticamente. Estas modificaciones post-traduccionales comprenden, pero no se limitan a, escisión proteolítica de las secuencias del extremo N tales como secuencias líder y/o pro-secuencias, eliminación proteolítica de las extensiones del extremo C, N- y/o O-glucosilación, lipidación, acilación, desamidación, formación de piroglutamato, fosforilación y/u otras, o cualquier combinación de las mismas, como se producen durante la producción/expresión por el huésped nativo o cualquier huésped adecuado para la expresión. Estas modificaciones post-traduccionales pueden tener influencia o no sobre las propiedades físicas y enzimáticas de las enzimas que se exploran en el presente documento.

Preferentemente, dichos cambios dan lugar a propiedades mejoradas de la enzima tales como

1. Mayor termoestabilidad y/o
2. Mayor actividad específica y/o
3. Estabilidad mejorada a pH bajo y/o
4. Mayor resistencia contra la escisión proteolítica por proteasas tales como la pepsina; y/o
5. Alta actividad residual a bajo pH.

En realizaciones preferidas de la presente divulgación, la mananasa modificada tiene además de las sustituciones en las posiciones 201, 207, 274, 66, 215 y 259 una sustitución en una o más de las posiciones 1, 97, 113, 146, 149, 173, 181, 280, 282, 331 o 344, con respecto a la numeración de la mananasa parental/ de tipo silvestre que se da en SEQ ID NO: 1. Estas posiciones se caracterizan porque la mutagénesis de la enzima en estas posiciones da lugar a una mejora de las características enzimáticas deseadas.

Incluso básicamente, varias sustituciones de aminoácidos con respecto a la mananasa parental/de tipo silvestre han terminado siendo beneficiosas en términos de termoestabilidad, tanto por sí mismas y/o en combinación con otras. Estas sustituciones se muestran en la Tabla 3. Además, varias sustituciones de aminoácidos también han terminado siendo bastante beneficiosas en términos de estabilidad al pH, estabilidad contra las proteasas (particularmente pepsina) y/o actividad específica. Estas sustituciones se muestran en la Tabla 4.

En otro aspecto más, la divulgación se refiere a una molécula de ácido nucleico y al uso de una molécula de ácido nucleico que se selecciona de entre el grupo que consiste en

- (a) una molécula de ácido nucleico que codifica una mananasa modificada de acuerdo con la descripción anterior,
- (b) la molécula de ácido nucleico que se presenta como SEQ ID NO: 5,
- (c) una molécula de ácido nucleico que es la complementaria de la molécula que se presenta en SEQ ID NO: 5,
- (d) una molécula de ácido nucleico que es capaz de hibridarse con la molécula de ácido nucleico que se presenta en SEQ ID NO: 5.

Se considera que un nucleótido o ácido nucleico se hibrida con uno de los nucleótidos anteriores si es capaz de hibridarse en condiciones de alta rigurosidad, incluso más preferentemente en condiciones de rigurosidad muy alta.

Para preparar la transferencia de hibridación, se pueden utilizar protocolos de biología molecular convencionales para la transferencia (por ejemplo, transferencias de Southern para las hibridaciones de ADN). La cantidad de ADN diana depende de la abundancia relativa de la secuencia diana. Si se va a utilizar una secuencia diana pura, se prefiere entre 1 y 5 picogramos de ADN por kilobase de polinucleótido. Típicamente, el límite de detección es aproximadamente de 0,5 pg de ADN para una sonda radioactiva con una actividad específica de 10^9 dpm/mg que es equivalente a una copia del gen única de 500 pb de longitud en 3,3 mg de ADN genómico de un genoma complejo (por ejemplo, humano). En la práctica se usarán aproximadamente 10 mg de ADN genómico - por ejemplo para la exploración de organismos, tales como microorganismos, que contienen un polinucleótido que codifica una mananasa de la divulgación. Si el ADN diana es bacteriano o un plásmido se tendrá que diluir el ADN con el fin de evitar la sobre-exposición. El ADN diana se transfiere, por ejemplo, por transferencia puntual, o por transferencia en un gel de electroforesis. Las condiciones preferidas se describen en 'Membrane Transfer and Detection Methods, Amersham International plc, UK.- PI/162/85/1. Se utiliza preferentemente una membrana de nilón cargada positivamente Hybond N+ (Amersham Life Science). La sonda se prepara preferentemente de acuerdo con el kit de marcado 'Ready to Go DNA™' de Pharmacia para preparar una sonda de $> 1 \times 10^9$ dpm/microgramo. La sonda se utiliza en un tampón de hibridación a una concentración de 1×10^6 dpm por mililitro de tampón de hibridación. Las transferencias se pre-hibridan preferentemente en tampón de hibridación (6 x SSC, 5 x solución de Reinhardt, y un 0,5 % de SDS, y ADN de esperma de salmón desnaturalizado hasta 100 mg/ml de tampón) durante una hora a 65° C. La(s) transferencia(s) se lavan entonces con un volumen adecuado de tampón de lavado (típicamente 50 ml) en 2 x SSC, 0,1 % de SDS durante 30 minutos a 65° C, seguido por un segundo lavado con un volumen adecuado de tampón de lavado (típicamente 50 ml) en el mismo tampón de lavado (2 x SSC, 0,1 % de SDS) para lavado de rigurosidad media, o 0,1 % x SSC, 0,1 % de SDS durante 10 minutos a 65° C (alta rigurosidad), el segundo lavado se puede repetir a 70° C para lavado de rigurosidad muy alta. La molécula de ácido nucleico de la presente

divulgación puede comprender secuencias de nucleótido que codifican la SEQ ID NO: 1 o un fragmento eficaz de la misma o una variante, forma modificada, homóloga o derivada de la misma.

En particular, la divulgación proporciona un plásmido o sistema de vector que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una mananasa como se describe en el presente documento. Preferentemente, el plásmido o sistema de vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica los aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. Adecuadamente el plásmido o sistema de vector es un vector de expresión para la expresión de cualquiera de las enzimas codificadas por una secuencia de ácido nucleico como se expone en cualquiera de las de SEQ ID NO: 4 en un microorganismo. Los vectores de expresión adecuados se describen en el presente documento. Además, la divulgación proporciona un plásmido o sistema de vector para la expresión de cualquiera de las enzimas modificadas o variantes o fragmentos funcionales que se describen en el presente documento. Los vectores de expresión adecuados se describen en el presente documento.

Las mejoras en las características de mananasa de acuerdo con la presente divulgación se refieren a su uso en una variedad de procesos técnicos tales como pero sin limitarse a su uso como aditivo para productos alimentarios y piensos, para el procesamiento de alimentos y piensos, producción de pasta y papel, así como para la estimulación de pozos petrolíferos/ de gas por fractura hidráulica, generación de formulaciones de liberación lenta de fármacos o en detergentes, en particular en la retirada de biopelículas bacterianas. En particular, las mejoras se refieren a la estabilidad enzimática en condiciones de estas u otras aplicaciones y/o para la estabilidad durante el tránsito estomacal en el caso de un alimento o aditivo de pienso y/o para la actividad o estabilidad en el estómago y/o el tracto intestinal de un ser humano o un animal en las condiciones ácidas del tracto gastrointestinal superior. Dichas mejoras comprenden, entre otros parámetros, el aumento de estabilidad a temperaturas elevadas, preferentemente a temperaturas por encima de 60° C y/o el aumento de estabilidad frente a la digestión proteolítica, preferentemente frente a proteasas del tracto digestivo y/o el aumento de estabilidad a pH bajo y/o la actividad en valores de pH bajo y/o la eficacia general de liberación de manosa y/u oligomanosas a partir de grandes carbohidratos que contienen polimánosa.

El aumento de estabilidad a temperaturas elevadas se cuantifica por la temperatura de inactivación de la enzima. La temperatura de inactivación se define como la temperatura a la que la actividad residual de una enzima mananasa tras una incubación de cierta duración y el posterior enfriamiento a temperatura ambiente es el 50 % de la actividad residual de la misma enzima mananasa incubada la misma duración en las mismas condiciones a temperatura ambiente.

Las diferencias en termoestabilidad son las diferencias en° C entre las temperaturas de inactivación de dos enzimas. En una realización preferida de la divulgación las variantes de mananasa se aplican en procesos a elevadas temperaturas, produciendo variantes de mananasa con una deseable temperatura de inactivación más alta.

Cuando se comparan con la mananasa de tipo silvestre, las manansas de la divulgación se caracterizan por una mayor actividad residual tras la incubación térmica a temperaturas por encima de la temperatura de inactivación de la mananasa de tipo silvestre, proporcionando mayor estabilidad de procesamiento.

Clonación de mananasa de T. reesei: Además de la mananasa de *Trichoderma reesei* que se muestra en SEQ ID NO: 1 se clonó una mananasa adicional de *Trichoderma reesei* que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 1 con una sustitución de serina por arginina en la posición 3 (mutación S3R). Esta variante de mananasa se comparó con la mananasa de *Trichoderma reesei* de acuerdo con SEQ ID NO: 1 en cuanto a estabilidad térmica y actividad catalítica en la liberación de manosa a partir de un sustrato que contenía polimánosa. Los resultados que se presentan en la Figura 10 demuestran que la sustitución S3R no tiene efectos sobre las propiedades relevantes para la divulgación y por lo tanto es una mutación neutra (véase también el documento WO 2008/009673). Por lo tanto, en el contexto de la presente divulgación el término "wt" o "mananasa wt", "mananasa tipo silvestre" o "mananasa de *Trichoderma reesei*" se entiende que comprende las manansas de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y la mananasa de acuerdo con SEQ ID NO: 1 que tiene además la mutación neutra S3R.

Termoestabilidad en tampón: En una realización preferida de la divulgación, las variantes de mananasa tienen un aumento de la actividad residual y/o temperatura de inactivación cuando se incuban a temperaturas > 60° C durante > 30 min. En una realización más preferida el aumento de actividad residual y/o temperatura de inactivación se obtiene tras la incubación en un tampón de acetato durante 45 min. Preferentemente, la temperatura de inactivación de la variante de mananasa es > 68° C, más preferentemente > 70° C o > 72° C o > 74° C, o más preferentemente > 84° C. Las temperaturas de inactivación específicas se presentan en la tabla 3 junto a sus respectivas mutaciones.

Proteínas de fusión: También se tiene que entender que la secuencia de aminoácidos que se revela en SEQ ID NO: 1 y los derivados de la misma que se describen en el presente documento para su uso de acuerdo con la presente divulgación se pueden producir como una proteína de fusión en el extremo N y/o C, por ejemplo, para ayudar a la extracción, detección y/o purificación y/o para añadir propiedades funcionales a la molécula de mananasa. La pareja de la proteína de fusión puede ser cualquier proteína o péptido que incluya cualquier secuencia polipeptídica derivada del huésped nativo, cualquier otra secuencia de aminoácidos de origen natural así como secuencias sintéticas. Ejemplos de parejas de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o de activación de la transcripción), marcadores FLAG, MYC, u otros

marcadores bien conocidos por un experto en la técnica. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre la pareja de la proteína de fusión y la secuencia proteica de interés para permitir la retirada de las secuencias proteicas de fusión. Preferentemente, la proteína de fusión no dificultará la actividad de la secuencia proteica de interés.

- 5 En una realización preferida de la divulgación las variantes de mananasa se fusionan a dominios funcionales que incluyen péptidos líderes, pro-péptidos, dominios de unión o dominios catalíticos.

Los dominios de unión pueden incluir, pero no se limitan a, dominios de unión a carbohidratos de varias especificidades, que proporcionen un aumento de afinidad por los componentes de carbohidrato presentes durante la aplicación de la mananasa. También se ha ideado que el dominio de fusión puede comprender dominios 10 enzimáticamente activos, tales como actividades que apoyen la acción de la mananasa en la producción del producto deseado proporcionando actividad en uno o más componentes del sustrato y/o sobre cualquier producto de la reacción catalítica de la mananasa. Ejemplos no limitantes de dominios catalíticos incluyen: celulasas, hemicelulasas tales como xilanasas, exo-mananasas, glucanasas, arabinasas, galactosidasas, pectinasas, y/u otras actividades tales como proteasas, lipasas, fosfatasas ácidas y/u otras o fragmentos funcionales de las mismas.

- 15 *Engarces:* Las proteínas de fusión pueden unirse a la mananasa opcionalmente por medio de una secuencia de engarce que comprende preferentemente menos de 100 aminoácidos, más preferentemente menos de 50 aminoácidos, menos de 30 aminoácidos o menos de 20 aminoácidos. El engarce puede unirse simplemente a la mananasa y el dominio de fusión sin afectar significativamente las propiedades de cada componente, o puede 20 opcionalmente tener una importancia funcional en la aplicación que se pretende debido a su composición de aminoácidos, estructura y/o modificación post-traducciona que se producen durante la expresión en el huésped nativo o cualquier huésped heterólogo adecuado. El origen de la secuencia engarce puede ser a partir de una secuencia de aminoácidos de cualquier organismo o cualquier secuencia peptídica sintética.

Proteínas adicionales: Las mananasas que se describen en el presente documento para su uso de acuerdo con la presente descripción también se pueden utilizar en conjunción con una o más proteínas adicionales de interés (PDI) 25 o secuencias de nucleótidos de interés (NDI). Ejemplos no limitantes de PDI incluyen: fitasas, hemicelulasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lactasas, beta-glucanasas, endo-beta-1,4-glucanasas, celulasas, xilosidasas, xilanasas, xiloglucanasas, xilano acetil-esterasas, galactanasas, exo-mananasas, pectinasas, pectina liasas, pectinesterasas, poligalacturonasas, arabinasas, ramnogalacturonasas, lacasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, proteasas, amilasas, fosfatasas, enzimas lipolíticas, cutinasas y/u otras. Estas incluyen 30 enzimas que, por ejemplo, modulan la viscosidad de la solución/suspensión de sustrato o aumentan la accesibilidad y/o solubilidad del sustrato de polimánosa. El NDI puede ser incluso una secuencia antisentido de cualquiera de las secuencias. Como se ha descrito anteriormente, la PDI puede ser incluso una proteína de fusión. La PDI puede incluso fusionarse con una secuencia de secreción. En una realización ventajosa, la variante de mananasa de acuerdo con la presente divulgación se utiliza en conjunto con al menos una fitasa.

- 35 Otras secuencias también pueden facilitar la secreción o aumentar el rendimiento de la PDI secretada. Dichas secuencias podrían codificar proteínas chaperona como por ejemplo el producto del gen *cyp B* de *Aspergillus nigger* que se describe en la solicitud de patente RU 9821198.0.

El NDI que codifica la PDI puede modificarse con el fin de alterar su actividad por varias razones, que incluyen, pero 40 no se limitan a, alteraciones que modifican el procesamiento y/o la expresión del producto de expresión de las mismas. A modo de ejemplo adicional, el NDI puede también modificarse para optimizar la expresión en una célula huésped particular. Puede que se deseen otros cambios de secuencia con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción.

El NDI que codifica la PDI puede incluir en el mismo nucleótidos sintéticos o modificados - tales como armazones metilfosfonato y fosforotioato.

- 45 El NDI que codifica la PDI puede modificarse para aumentar la estabilidad intracelular y la semivida. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, la adición de secuencias flanqueantes de los extremos 5' y/o 3' de la molécula o el uso de fosforotioato o 2' O-metilo mejor que enlaces fosfodiéster en el armazón de la molécula.

Expresión de genes de mananasa: Con el fin de producir una enzima mananasa, el ADN que codifica la enzima puede sintetizarse químicamente a partir de secuencias publicadas u obtenerse directamente a partir de células 50 huésped que albergan el gen (por ejemplo, por exploración en bibliotecas de ADNc o amplificación por PCR). El gen de mananasa se puede incluir en un casete de expresión y/o clonarse en un vector de expresión adecuado por técnicas convencionales de clonación molecular. Dichos casetes de expresión o vectores que contienen a menudo secuencias que ayudan al inicio y terminación de la transcripción (por ejemplo, promotores y terminadores), y pueden contener marcadores genéticos. Los casetes también pueden estar compuestos por más o menos cadenas 55 de ARNm, y su expresión puede incluir o no ciertos dominios de la proteína, tales como dominios de unión a polímeros (por ejemplo, dominios de unión a carbohidratos) de distintas especificidades. El casete de expresión o vector puede introducirse en una célula huésped adecuada para la expresión que entonces expresará el correspondiente gen de mananasa. Los huéspedes para la expresión particularmente adecuados son géneros bacterianos huéspedes de expresión que incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *Escherichia coli*), *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. fluorescens* o *P. stutzeri*), *Proteus* (por ejemplo, *Proteus mirabilis*), *Ralstonia* (por ejemplo, *Ralstonia* 60

eutropha), *Streptomyces*, *Staphylococcus* (por ejemplo, *S. carnosus*), *Lactococcus* (por ejemplo, *L. lactis*), bacterias acidolácticas o *Bacillus* (*subtilis*, *megaterium*, *licheniformis*, etc.). También son particularmente adecuadas levaduras huéspedes de expresión tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces combe*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis* o *Pichia pastoris*. Especialmente adecuados son los huéspedes de expresión fúngicos tales como *Aspergillus niger*, *Chryso sporium lucknowense*, *Aspergillus* (por ejemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans*, etc.) o *Trichoderma reesei*. También son adecuados los huéspedes de expresión de mamífero tales como líneas celulares de ratón (por ejemplo, NS0), de Ovario de Hámster Chino (CHO) o de Riñón de Hámster recién nacido (BHK), sistemas de mamífero transgénico tales como de conejo, cabra o ganado bovino, otros huéspedes eucariotas tales como células de insecto o sistemas de expresión víricos tales como bacteriófagos como M13, fago T7 o Lambda, o virus tales como sistemas de expresión de Baculovirus, o de plantas.

Los genes de mananasa se introducen en las células huésped de expresión por varios procedimientos de transformación que incluyen pero no se limitan a, electroporación, transformación o transfección asistida por lípidos ("lipofección"), transfección mediada químicamente (por ejemplo, con CaCl y/o CaP), transformación mediada por acetato de litio (por ejemplo, de protoplastos de células huésped), transformación biolística con una "pistola genética", transformación mediada por PEG (por ejemplo, de protoplastos de células huésped), fusión de protoplastos (por ejemplo, utilizando protoplastos bacterianos o eucariotas), transformación mediada por liposomas, *Agrobacterium tumefaciens*, adenovirus u otra transformación o transducción vírica o por fagos.

De manera alternativa, las variantes enzimáticas se expresan intracelularmente. Opcionalmente, tras la expresión intracelular de las variantes enzimáticas, se puede utilizar una etapa de lisis o permeabilización para la secreción en el espacio periplásmico utilizando secuencias de señal tales como las que se han mencionado anteriormente, para liberar la enzima mananasa en el sobrenadante. La alteración de la barrera de membrana puede efectuarse con el uso de medios mecánicos tales como ondas ultrasónicas, tratamiento por presión (prensa de French), cavitación o el uso de enzimas que digieren la membrana tal como lisozima y mezclas enzimáticas. Como una alternativa adicional, los genes que codifican la enzima mananasa se expresan libres de células con el uso de un sistema de expresión libre de células. Por ejemplo, se utilizó el extracto S30 de células *Escherichia coli* con este fin para sistemas disponibles en el mercado (por ejemplo, tecnología CECF de Roche Applied Science, Inc.). En los sistemas libres de células, el gen de interés se transcribe típicamente con la asistencia de un promotor, pero la unión para formar un vector de expresión circular es opcional. El ARN también puede añadirse exógenamente o generarse sin transcripción y traducirse en sistemas libres de células. Las configuraciones de las construcciones de expresión para la expresión y ejecución *in vitro* de todos los sistemas de expresión anteriores se encuentran entre las capacidades del experto en la técnica.

Los procedimientos anteriores de clonación y expresión del gen de la mananasa de *Trichoderma reesei* son adecuados para la expresión a escala industrial y para su uso en escenarios de alto rendimiento para la evaluación de variantes mutadas.

Purificación: Como se ha descrito anteriormente, las proteínas mananasa se pueden expresar en una variedad de sistemas de expresión y en consecuencia se tienen que seleccionar los procedimientos adecuados de procesamiento corriente abajo y purificación. La proteína de interés se puede secretar en el espacio extracelular o periplásmico o se expresa intracelularmente. En una realización ventajosa de la divulgación la variante de mananasa se expresa en un huésped microbiano y la proteína se secreta en el espacio periplásmico o extracelular. Las células que expresan las variantes de mananasa se conservan por procedimientos bien conocidos por alguien experto en la técnica, tales como, pero sin limitarse a, criomacemamiento. Los cultivos del organismo de expresión se preparan en un volumen adecuado con procedimientos de fermentación convencionales. En una realización preferida, los cultivos para la expresión de proteínas se inoculan a partir de una criomateria prima y el volumen del cultivo se aumenta sucesivamente en los envases apropiados. En una realización preferida las células se cultivan en un fermentador y opcionalmente se controlan las condiciones de cultivo tales como el pH, la temperatura, el oxígeno y/o el suministro de nutrientes. Una primera etapa de purificación comprende la separación de células del sobrenadante utilizando una o más de varias técnicas, tales como sedimentación, microfiltración, centrifugación, floculación u otras. En una realización preferida el procedimiento que se aplica es microfiltración. En el caso de expresión intracelular, las células se someten a tratamientos que dan como resultado la liberación de la proteína a partir del espacio intracelular. Estos tratamientos pueden comprender por ejemplo, tratamiento por presión, enzimático, choque osmótico, congelación, u otro tratamiento para producir un extracto celular que pueda someterse o no a una purificación adicional.

En una realización ventajosa de la divulgación la proteína se secreta en el sobrenadante y una etapa opcional de purificación comprende la concentración del sobrenadante por ultrafiltración. Se puede llevar a cabo una purificación proteica adicional a partir del sobrenadante o el sobrenadante concentrado con uno o más de varios procedimientos que comprenden procedimientos de extracción o fractura tales como precipitación en sulfato amónico o etanol o ácido, o procedimientos cromatográficos que incluyen pero no se limitan a cromatografía por intercambio iónico, interacción hidrofóbica, hidroxilapatita, fractura por tamaño por filtración en gel, fosfocelulosa o lectina y cromatografía de afinidad o cualquier combinación de las mismas. En un procedimiento más preferido la proteína marcada por afinidad se purifica por cromatografía de afinidad por quelatos metálicos para obtener una proteína de alta pureza.

Los procedimientos de purificación preferidos producen una pureza de la proteína > 30 %, en un procedimiento más preferido la pureza es > 50 %, > 60 %, > 70 %, o > 80 %. En un procedimiento más preferido la pureza es > 90 %, en un procedimiento más preferido la pureza es > 95 % y en un procedimiento más preferido la pureza es > 98 %.

5 En otra realización ventajosa de la divulgación el sobrenadante o el sobrenadante parcialmente purificado por ultrafiltración o el sobrenadante concentrado y/o diafiltrado se seca por uno cualquiera de varios procedimientos técnicos tales como, pero sin limitarse a, secado por pulverización, liofilización, evaporación por corriente descendente, evaporación de capa fina, evaporación por centrifugación, secado en cinta transportadora o cualquier combinación de los mismos.

10 En una realización ventajosa adicional de la divulgación la suspensión celular fermentada que incluye las variantes de mananasa expresadas se seca como un todo utilizando procesos tales como, pero que no se limitan a, secado en lecho fluidificado, secado en cinta continua, secado por pulverización o secado en tambor o cualquier combinación de los mismos.

15 *Formulaciones:* En general, las composiciones de la mananasa o cualquier derivado descrito en el presente documento pueden ser líquidas o secas. Las composiciones líquidas pueden comprender la mananasa sola o en combinación con otras proteínas o enzimas y pueden contener aditivos que mantengan la estabilidad y/o la actividad de la mananasa u otras proteínas o enzimas de la composición. Estos incluyen pero no se limitan a glicerol, sorbitol, propilenglicol, sales, azúcares, conservantes, tampones para el pH y carbohidratos. Típicamente, la composición líquida es una suspensión con base oleosa o acuosa, suspensión o solución.

20 Las composiciones secas se pueden generar a partir de cualquier composición líquida que incluya el sobrenadante de la fermentación o la suspensión celular o de extracto celular por secado por pulverización, liofilización, evaporación por corriente descendente, evaporación de capa fina, evaporación por centrifugación, secado en cinta continua o cualquier combinación de los mismos. Las composiciones secas pueden ser granulados de un tamaño apropiado que sea compatible con las aplicaciones adicionales corriente abajo tales como el procesamiento de alimentos o piensos o para cumplir los requisitos para ser un componente de alimentos o piensos para animales.

25 Antes del secado se puede añadir un agente de volumen a la composición líquida que, tras el secado, aumente eficazmente las propiedades de la composición seca tal como proporcionar una mayor estabilidad al calor debido a la protección de la enzima de factores ambientales por el reactivo de volumen, mejores propiedades técnicas de manejo y otras.

30 Una vez que se obtenga una preparación seca, se puede preparar la aglomeración en granulados utilizando técnicas de aglomeración, por ejemplo, en un mezclador con cizalladura durante la cual se co-aglomeran un material de relleno y la enzima para formar gránulos. La absorción de los granulados se prepara con núcleos de un material de vehículo que absorben o son cubiertos por la enzima. Materiales de relleno típicos incluyen el sulfato disódico, caolín, talco, silicato de aluminio magnésico y fibras de celulosa. Opcionalmente, también se incluyen aglomerantes tales como dextrinas en la aglomeración de los granulados. Los materiales de vehículo típicos incluyen almidón, por
35 ejemplo en forma de yuca, maíz, patata, arroz y trigo, o se pueden utilizar sales.

Opcionalmente los granulados se revisten con una mezcla de revestimiento. Dicha mezcla comprende agentes de revestimiento, preferentemente agentes de revestimiento hidrófobos, tales como el aceite de palma hidrogenado y sebo de buey, y, si se desea, otros aditivos tales como carbonato cálcico y caolín.

40 En una realización particularmente preferida se pretende que las composiciones que comprenden las manansas de la divulgación sean para aplicaciones en el procesamiento de alimentos y piensos o como un suplemento de alimentos y piensos. En este caso, las composiciones de mananasa pueden contener adicionalmente otros sustituyentes tales como agentes colorantes, compuestos aromáticos, estabilizantes, vitaminas, minerales, otras enzimas mejoradoras de piensos y alimentos y similares. Esto se aplica en particular a las denominadas premezclas. Los aditivos alimentarios de acuerdo con la presente divulgación se pueden combinar con otros componentes
45 alimentarios para producir productos alimentarios procesados. Dichos otros componentes alimentarios incluyen uno o más de otros, preferentemente termoestables, suplementos enzimáticos, aditivos alimentarios vitamínicos, y aditivos alimentarios minerales. Los aditivos alimentarios combinados resultantes, que incluyen posiblemente varios tipos de compuestos diferentes se pueden mezclar entonces en una cantidad adecuada con los otros componentes alimentarios tales como proteínas de cereales o plantas para formar un producto alimentario procesado. El
50 procesamiento de estos componentes de un producto alimentario se pueden llevar a cabo utilizando cualquiera de los procedimientos disponibles actualmente.

55 En una realización ventajosa de la divulgación la composición de mananasa comprende adicionalmente una cantidad eficaz de una o más enzimas mejoradoras de piensos o alimentos, en particular que se seleccionan de entre el grupo que consiste en fitasas, hemicelulasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lactasas, beta-glucanasas, endo-beta-1,4-glucanasas, celulasas, xilosidasas, xilanasas, xiloglucanasas, xilano acetilesterasas, galactanasas, exo-manansas, pectinasas, pectina liasas, pectinesterasas, poligalacturonasas, arabinasas, ramnogalacturonasas, lacasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, proteasas, amilasas, fosfatasas, enzimas lipolíticas y cutinasas.

Las formulaciones de las mananasas de la divulgación se utilizan para el procesamiento y/o la fabricación de alimentos o piensos para animales.

Aplicaciones técnicas: Se ha previsto el uso de los derivados de mananasas como aditivos alimentarios o ayudas digestivas que promueven la degradación de oligomanosa que está contenida en el material alimentario, liberando de esta manera las oligomanosas potencialmente beneficiosas o los derivados de las mismas.

Otra aplicación en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es la producción de mano-oligosacáridos como prebióticos importantes a partir de la PKE en los piensos y alimentos. Con el tratamiento de la PKE u otros galactomananos que contienen componentes con mananasa se producen mano-oligosacáridos y D-manosa. Los mano-oligosacáridos se utilizan como componentes prebióticos para los piensos y alimentos: Los mano-oligosacáridos promueven el crecimiento de probióticos (por ejemplo, Bifidobacterias y *Lactobacillus sp.*), inhiben el crecimiento de las enterobacterias *Salmonella*, neutralizan las propiedades antinutricionales de las lectinas y tienen aplicaciones en la industria farmacéutica. Además se sospecha que los mano-oligosacáridos y especialmente la manosa son componentes inmunoestimulantes en piensos compuestos.

Otra aplicación más en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es la escisión de componentes que contienen manano en la pared celular de frutas para una mayor recuperación de zumo, por ejemplo, añadiendo dichas enzimas a piñas, limones, naranjas, limas, pomelos, antes del procedimiento de exprimido. Una aplicación ventajosa es el uso de variantes de mananasa de acuerdo con la presente divulgación en procesos de panadería, por ejemplo, para galletas, pan, etc.

Otra aplicación en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es el uso de la mananasa de acuerdo con la presente divulgación para mejorar el rendimiento de la extracción de aceite de palmiste. El contenido de aceite remanente en la torta de presión de palmiste es entre un 5-12 % tras la presión. Este remanente se puede reducir adicionalmente por extracción química aproximadamente en un 3 %. Con la aplicación de una mananasa de acuerdo con la divulgación, la liberación del aceite podría aumentarse rápidamente, proporcionando de esta manera un proceso mejorado. Adicionalmente la torta de presión de palmiste resultante sería de mejor calidad debido al contenido reducido de fibras de galactomanano que se sabe que son componentes antinutritivos en los piensos.

Otra aplicación más en el campo del procesamiento de alimentos y piensos es el suministro de D-manosa a partir de la PKE u otros componentes que contienen galactomanano. La harina de palmiste contiene aproximadamente un 20 % de manosa unida a las fibras de galactomanano. El tratamiento de la PKE, copra u otras sustancias brutas que contienen galactomanano con mananasas producen la liberación de D-manosa. La manosa y sus derivados son ingredientes que se utilizan en los alimentos (por ejemplo, en productos alimentarios dietéticos bajos en calorías), productos farmacéuticos (la manosa cura más del 90 % de todas las infecciones del tracto urinario), cosméticos, textiles y en la fabricación de polímeros. Debido al suministro limitado la manosa es muy cara actualmente en comparación con otros azúcares hexosas más comunes y su suministro es escaso. La D-manosa también se puede utilizar como un material en bruto para la producción de manitol. El manitol mismo se deriva de la manosa por medio de una reducción con rendimientos mucho más altos y menos productos secundarios que la conversión a partir de fructosa. El manitol es un poliol utilizado ampliamente en los alimentos y en las industrias farmacéuticas debido a sus propiedades funcionales únicas: El manitol se utiliza como edulcorante, para formulaciones farmacéuticas (comprimidos masticables y polvos granulados), en la producción de chicle, dando cuerpo, textura y como agente anti-aglutinante en los alimentos, como componente farmacéutico osmoactivo y de alimentos para diabéticos.

Además, en el contexto anterior del procesamiento de alimentos y piensos se proporciona el uso de una mananasa de acuerdo con la divulgación para la hidrólisis parcial de galactomananos por incubación en goma guar o goma de algarrobo. Las hidrolasas resultantes se utilizan en la industria alimentaria y de bebidas como componentes que dan textura y para aplicaciones farmacéuticas.

Producción de azúcares: Las enzimas de mananasa descritas en la presente divulgación son particularmente útiles en la producción de azúcares u oligosacáridos a partir del material vegetal que contiene polimanosa tal como el palmiste, coco, konjac, goma de algarrobo, goma guar y semillas de soja.

Se prefieren un material vegetal como la harina de palmiste, las tortas de presión de palmiste, harina de copra, aglomerados de copra y vainas de soja.

En una realización preferida en particular las enzimas de mananasa de acuerdo con la presente divulgación se aplican para la producción de manosa y mano-polímeros tales como manobiosa, manotriosa, manotetraosa, manopentosa, manohexosa, manoheptosa, mano-octosa, manononaosa y polímeros mayores de manosa y/o derivados de las mismas. También se prefieren los galactosil mano-oligosacáridos de las mismas con diferentes proporciones entre galactosa y manosa que varían desde 1 a 0,05.

En una realización preferida adicional de la presente divulgación los azúcares se componen de manosa y glucosa y se hace referencia a los mismos como glucomananos. Estos polioles pueden estar compuestos por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más monómeros de manosa y/o glucosa con un contenido en manosa de 1/15, 1/14, 1/13, 1/12, 1/11, 1/10, 1/9, 1/8, 1/7, 1/6, 1/5, 1/4, 1/3, 1/2, 1, 2/3, 3/4, 3/5, 4/5, 5/6, 2/7, 3/7, 4/7, 5/7, 6/7, 3/8, 5/8, 7/8, 2/9, 4/9, 3/10, 2/11, 4/11, 3/12, 2/13 o 1/14. También son particularmente preferidos los galactosil glucomanano-oligosacáridos de los mismos

con diferentes proporciones entre galactosa y manosa que varían desde 1 a 0,05.

En una realización preferida adicional de la presente divulgación la mananasa se utiliza en combinación con otros carbohidratos tipo glucanasa, y/o xilanasas, y/o alfa-galactosidasa y/o celulasa para la hidrólisis del material vegetal con el fin de generar los azúcares.

- 5 En una realización más preferida de la presente divulgación la hidrólisis del material vegetal que contiene polimánosa da lugar a azúcares que presentan funcionalidad prebiótica. Estos azúcares se generan para promover el crecimiento de probióticos, bacterias que se sabe que mantienen el sistema inmunitario saludable. Ejemplos de tales bacterias son bifidobacterias. Las bifidobacterias conocidas son *B. adolescensis*, *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. gallium*, *B. gallinarum*, *B. inclicum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum* y *B. thermophilum*.

- 15 *Extracción a partir del café:* Las enzimas mananasas que se describen de acuerdo con la presente divulgación son útiles para la hidrólisis del galactomanano que está presente en los extractos líquidos de café. En una realización preferida de la divulgación la mananasa se utiliza para inhibir la formación de geles que se producen durante el secado por congelación de extractos líquidos de café. La disminución de la viscosidad del extracto reduce el consumo de energía durante el secado. En una realización más preferida de la divulgación las enzimas mananasa se aplican en una forma inmovilizada que reduce el consumo de enzima y evita la contaminación del extracto de café.

- 20 En este contexto, otra aplicación interesante es el uso de las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación para la producción de manosa o mano-oligosacáridos a partir de residuos de café, con el fin de obtener productos de mayor valor. Como se ha descrito anteriormente la mananasa libera manosa u oligosacáridos a partir de los residuos de café que son componentes de alto valor funcional en los piensos y alimentos. En la industria de bebidas de café, los granos de café gastados se utilizan generalmente como combustible o se tratan como un residuo industrial. El café tostado contiene 1,8-4,4 % de manano. Por lo tanto los granos de café gastados contienen una gran cantidad de β -manano, que se puede convertir en mano-oligosacáridos por hidrólisis enzimática. Se dice que los mano-oligosacáridos que se obtienen del manano del café reducen los niveles de lípidos del suero en seres humanos (Jpn J food eng 6 (2005)).

- 30 *Pienso para animales:* Varios factores antinutricionales limitan el uso de materiales vegetales específicos en la preparación de piensos para animales y alimentos para seres humanos. Se ha descrito que el material vegetal que contiene oligomananos como manano, galactomanano, glucomanano y galactoglucomanano reduce la digestibilidad y absorción de compuestos nutricionales como minerales, vitaminas, azúcares y grasas por los animales. Los efectos negativos son debidos en particular a la alta viscosidad de los manopolímeros y a la capacidad de los manopolímeros para adsorber compuestos nutricionales. Estos efectos se pueden eliminar/reducir por medio del uso de enzimas que degradan manopolímeros, a saber enzimas mananasa que permiten entonces una mayor proporción de material vegetal barato que contiene manopolímeros en los piensos y por lo tanto una reducción de los costes. Adicionalmente, por medio de la actividad de las enzimas mananasa se rompen los manopolímeros en monosacáridos que se pueden asimilar fácilmente y proporcionar una energía adicional.

- 40 Para poder utilizar una enzima como un suplemento de piensos eficaz para por ejemplo, animales monogástricos tales como las aves de granja o los cerdos tiene que ser estable en el estómago. Esto significa que tiene que ser estable a pH bajo (aproximadamente un pH de 2-3) y adicionalmente tiene que ser resistente contra la pepsina a este pH bajo. Además dichas enzimas necesitan ser activas a pH bajo (aproximadamente un pH de 3,0) para que sean eficaces en el estómago. Las enzimas mananasa que se proporcionan en la presente divulgación cumple todos estos criterios al contrario que otras enzimas mananasa como por ejemplo la mananasa de *Trichoderma reesei* tipo silvestre que no es estable a pH bajo, en particular no es estable contra la pepsina a pH bajo. Por lo tanto las enzimas mananasa que se proporcionan en la presente divulgación se ajustan bien a las aplicaciones para los piensos en las que la enzima tiene que ser activa en el animal.

- 45 Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación son útiles como aditivos del pienso para animales monogástricos tales como las aves de granja y cerdos, así como de los alimentos para seres humanos. El pienso sin embargo, se puede proporcionar a patos, gansos, así como a bovinos, caninos, caprinos, equinos, felinos, así como a crustáceos y peces. Las enzimas mananasa también se pueden utilizar para pretratar el pienso en vez de añadirlas al pienso.

- 55 En una realización ventajosa de la divulgación las enzimas mananasa se añaden al pienso para cerdos en destete, cerdos en guardería, lechones, cerdos en engorde, cerdos en crecimiento, cerdos en finalización, gallinas ponedoras, pollos broiler, pavos.

- 60 En una realización ventajosa adicional de la divulgación las enzimas mananasa son aditivos para el pienso compuesto por material vegetal como el palmiste, coco, konjac, goma de algarrobo, goma guar, semillas de soja, cebada, avena, lino, trigo, maíz, linaza, pulpa de cítricos, semillas de algodón, cacahuete, semillas de colza, girasol, guisantes, altramuza, y vitaminas así como por minerales. En una realización más preferida de la divulgación las enzimas mananasa son aditivos para piensos parcialmente compuestos de harina de palmiste, tortas de palmiste,

harina de copra y/o vainas de soja.

5 En una realización ventajosa adicional de la divulgación las enzimas mananasa se utilizan en combinación con otras enzimas que se seleccionan de entre el grupo que consiste en, pero sin limitarse a, fitasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, pectinasas, xilanasas, arabinoxilanasas, proteasas, beta-glucanasas, celulasas, galactanasas, endoglucanasas, xilosidasas, cutinasas, lipasas y/o fosfolipasas para la preparación de piensos. Las enzimas mananasas con o sin enzimas adicionales se pueden utilizar también en combinación con minerales, vitaminas y otros suplementos típicos del pienso.

10 Como las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación son enzimas termoestables pueden someterse a calentamiento sin perder actividad significativamente. Por lo tanto las enzimas mananasa se pueden utilizar en un proceso para producir pienso aglomerado en el que se aplica calor a la mezcla de pienso antes del paso de aglomerado, como es el caso en la mayoría de las fábricas de aglomerados comerciales. La enzima mananasa se puede añadir a los otros ingredientes del pienso antes de la etapa de aglomerado o después de la etapa de aglomerado a los gránulos de pienso que ya se han formado.

15 En una realización preferible adicional de la presente divulgación las enzimas mananasa se utilizaron en un pienso para animales que es especial para alimentar animales en circunstancias en las que no se desean antibióticos.

20 En una realización ventajosa las enzimas mananasas se utilizan en piensos animales parcialmente compuestos por harina de palmiste, tortas de presión de palmiste, harina de copra, aglomerado de copra y/o vainas de soja. En una realización más preferida las enzimas mananasa se utilizan en piensos de animales para pollos broiler que se componen parcialmente de harina de palmiste o tortas de presión de palmiste, harina de copra, aglomerados de copra y/o vainas de soja.

Industria de pasta de papel: Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación son útiles en el blanqueamiento de pastas de papel asistido por enzimas, tipo pastas químicas, pastas semi-químicas, pastas para envolver, pastas mecánicas o pastas preparadas por el procedimiento de sulfitos. Las pastas pueden también ser pastas libres de cloro blanqueadas con oxígeno, ozono, peróxido o peroxiácidos.

25 En una realización ventajosa de la presente divulgación las enzimas mananasa se utilizan para el blanqueamiento de pastas de papel asistido por enzimas que se producen por procedimientos modificados o continuos de reducción a pasta de papel que presenta contenidos de lignina bajos.

30 En una realización ventajosa adicional de la presente divulgación las enzimas mananasa en dichas aplicaciones pueden aplicarse solas o preferentemente en combinación con enzimas xilanasas y/o endoglucanasas y/o alfa-galactosidasa y/o celobiohidrolasa.

35 *Blanqueamiento y/o agente de desapresto en la industria textil:* Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación son también útiles para el blanqueamiento de fibras celulósicas sin algodón, hilo o tejido que comprenda lino, yute, ramio o ropa blanca por incubación de la fibra, hilo o tejido con una mananasa de acuerdo con la presente divulgación durante un tiempo determinado y en condiciones adecuadas para producir el blanqueamiento de la fibra, hilo o tejido. La degradación de hemicelulosa mejora el proceso de blanqueamiento del tejido.

40 En el estampado textil utilizando una pasta de imprimación que contiene un colorante y un polímero biológico (por ejemplo, goma guar) como espesante, la retirada del espesante y el exceso de colorante se hace mucho más eficaz por lavado del textil impreso en presencia de mananasa. La descomposición enzimática del espesante disminuye el tiempo de procesamiento así como la cantidad de energía y agua necesarias para conseguir una calidad satisfactoria del textil.

Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación son útiles en el desapresto de los tejidos fabricados a partir de, por ejemplo, fibras sintéticas en las que a menudo se utilizan galactomananos como la goma aguar o la goma de algarrobo como agentes de apresto.

45 *Estimulación de pozos petrolíferos y de gas por fractura hidráulica:* Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación son útiles en un procedimiento de fractura hidráulica que se utiliza en la estimulación de pozos petrolíferos y de gas. Aquí las enzimas mananasas actúan como agentes licuantes en un fluido hidráulico que se basa o se compone de un manopolímero y habitualmente contiene arena.

Como las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación son enzimas termoestables se utilizan preferentemente en aplicaciones de fractura hidráulica que se llevan a cabo a altas temperaturas.

50 En otra realización ventajosa de la divulgación la actividad de licuefacción de las enzimas mananasa en una aplicación de fractura hidráulica se controla (inhibe o promueve) por condiciones ambientales como el pH y la temperatura.

Detergentes: Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación se pueden utilizar en composiciones detergentes con el fin de retirar las manchas/suciedad que contienen manopolímeros. En una realización preferida

de la presente divulgación las enzimas mananasa se utilizan en composiciones detergentes en combinación con otras enzimas de entre el grupo de amilasas, celulasas, lipasas, pectinasas, proteasas y endoglucanasas.

5 *Retirada de biopelículas:* Las enzimas mananasa que se describen en la presente divulgación son útiles para la retirada de biopelículas que contienen manopolímeros. Preferentemente, para dicha aplicación las enzimas mananasas se utilizan en combinación con detergentes y/u otras enzimas de entre el grupo de alfa-galactosidasas, pectinasas, xilanasas, arabinoxilanasas, proteasas, beta-glucanasas, celulasas, galactanasas, endoglucanasas, xilosidasas, cutinasas y lipasas.

10 *Sistemas de suministro:* Las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación se pueden utilizar para el suministro de materia dirigido y/o dependiente del tiempo. Esto se consigue por medio del uso de sistemas que se basan en geles de manopolímeros que contienen y transportan materia. La función de la enzima mananasa en dicho sistema es la liberación controlada de la materia por degradación completa o parcial del gel, debido a un cambio específico en el ambiente del gel, por ejemplo, el pH y/o la temperatura que activan las enzimas mananasa.

En una realización ventajosa de la presente divulgación las enzimas mananasa se utilizan para el suministro dirigido de un fármaco en una aplicación farmacéutica.

15 Los recursos renovables, es decir, los sustratos de biomasa que se cultivan y se recolectan, como el grano, paja, madera y productos de la madera, están recibiendo más y más atención ya que son sustratos adecuados para la producción de combustibles biológicos, es decir, combustibles sólidos, líquidos, o gaseosos como el Biodiesel, Biogas, aceite vegetal, Bioetanol, Biobutanol, BioHidrógeno, Bio-Dimetil éter, Biometanol, combustible BTL ("Biomasa a líquido"), Combustible GTL ("Gas a líquido"), y similares. En los combustibles biológicos de 1ª
20 generación, dichas plantas se han convertido utilizando procedimientos establecidos en la industria alimentaria, es decir, se exprimirían con el fin de obtener el aceite vegetal o el almidón que contienen los granos, se convierte en azúcar y se fermentaba posteriormente con levaduras con el fin de obtener Bioetanol. Esto significa que se utilizan exclusivamente los depósitos de energía (es decir, la grasa y/o almidón) de dichas plantas. Esto da lugar a bajos rendimientos energéticos, o bajas cantidades de producción de combustible por acre. En los combustibles biológicos de 2ª
25 generación, no solo se van a utilizar los depósitos de energía de dichas plantas, sino que la estrategia tiende a utilizar la biomasa completa de la planta.

En este contexto, se puede utilizar una mananasa de acuerdo con la divulgación para convertir la biomasa vegetal que contiene hemicelulosa en azúcares, que se pueden metabolizar por una levadura específica (por ejemplo *Saccharomyces sp.*) o cepas bacterianas y otros microorganismos con el fin de producir productos de fermentación.
30 Estos productos de fermentación pueden ser combustibles como el Bioetanol, Biobutanol, pero también pueden ser moléculas de componentes básicos como ácido 3-Hidroxi propiónico, ácido aspártico, xilitol y ácido glucónico. Para otras moléculas de componente básico que se pueden derivar a partir de azúcares véase (Werpy y Petersen (2004) Top Value Added Chemicals from Biomass: Volumen 1-Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. National Renewable Energy Laboratory Report NREL/TP-510-35523, figura 3 y tabla 8).

35 Otros usos potenciales comprenden el procesamiento catalítico de productos que se han obtenido a partir de recursos renovables con ayuda de mananasas de acuerdo con la divulgación. Esto comprende el procesamiento de glucosa y/o fructosa, que se obtienen ambas con ayuda de una mananasa de acuerdo con la divulgación, en 2,5-dimetilfuranol, un compuesto heterocíclico que se supone que tiene propiedades mucho mejores que el bioetanol, ya que tiene un 40 % más de densidad energética, es químicamente estable e insoluble en agua.

40 Dichas estrategias extraen grandes beneficios de las propiedades mejoradas de las mananasas de acuerdo con la divulgación, particularmente del aumento de estabilidad al calor. Esto significa que la biomasa respectiva para la conversión en azúcares puede tener lugar a altas temperaturas, que aceleran los respectivos procesos y por lo tanto los hace económicamente más rentables.

En experimentos recientes de los inventores, se utilizaron sustratos de torta de presión de palmiste (PKE) para alimentar levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*). Dichos sustratos contenían aproximadamente un 37 % de galactomanano. Resulta que la PKE tratada con dos mananasas de acuerdo con la divulgación (es decir, la variante B, variante C y/o variante 31) daba lugar a la liberación de una gran cantidad de azúcares, y por lo tanto daba como resultado un mayor crecimiento de la levadura en comparación con la PKE sin tratar. Esto es una clara pista de la afirmación anterior, es decir, que las mananasas de acuerdo con la divulgación pueden ser una herramienta útil para
50 aumentar el rendimiento, por ejemplo, de la producción de Bioetanol a partir de recursos renovables (véase el ejemplo 19 del documento WO 2008/009673).

Todos los usos mencionados de una mananasa de acuerdo con la divulgación tienen en común que estas estrategias extraen beneficios sustanciales de las propiedades mejoradas de la mananasa de acuerdo con la divulgación, particularmente en términos de aumento de la termoestabilidad y aumento de la resistencia frente a
55 valores de pH bajos y enzimas proteasas.

Esto se debe principalmente al hecho de que la mayoría de los usos mencionados tienen lugar en ambientes con condiciones desfavorables, como en el tracto digestivo de mamíferos, donde predominan los valores de pH bajos, o las temperaturas elevadas que se aplican para acelerar, facilitar y optimizar económicamente los procesos de

hidrólisis como la conversión de recursos renovables en azúcares como se ha descrito anteriormente.

Los siguientes procedimientos y ejemplos se ofrecen con fines solamente ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente divulgación de ninguna manera.

Procedimientos y Ejemplos

- 5 En los siguientes ejemplos, se proporcionan materiales y procedimientos de la presente divulgación que incluyen la determinación de propiedades catalíticas de enzimas que se obtienen por el procedimiento. Se debería entender que estos ejemplos son solamente con fines ilustrativos y no se tienen que considerar como limitantes de la presente divulgación de ninguna manera.

Ejemplo 1: Purificación de enzimas mananasa por medio de un marcador His

- 10 La purificación de enzimas mananasa sin dominio de unión a carbohidratos (CBD) se llevó a cabo utilizando un marcador 6xHis fusionado en el extremo C de las enzimas mananasa.

Se cultivó *S. saccharomyces*, transformado con un plásmido que codificaba la mananasa marcada con 6xHis, en matraces con agitado a 30° C durante 72 h en medio de cultivo SC-galactosa. Las células de un medio de cultivo de 2 litros se retiraron por centrifugación y el sobrenadante se sometió a una concentración de 40 veces por ultrafiltración utilizando una membrana con un corte de 5 kDa. El concentrado se diafiltró posteriormente con el mismo corte por intercambio de tampón (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, pH 5,0) y concentración hasta un volumen final de 1/40 del volumen de cultivo. El concentrado se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se ajustó el pH a 8,0 justo antes de cargarlo en una columna de afinidad metálica (BD-Talon, BD-Bioscience). La columna se lavó con varios volúmenes de lecho de tampón de diafiltración pH 8,0. Se eluyó la mananasa con un gradiente desde el 0 % al 100 % de tampón B, teniendo en cuenta que el tampón B contiene 50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl y 250 mM de imidazol a un pH 6,0. Las muestras de proteína eluída se analizaron por SDS PAGE. Las fracciones que contenían mananasa se agruparon por cromatografía de fase inversa utilizando una absorción a 280 nm para la detección proteica.

Ejemplo 2: Purificación de enzimas mananasa con CBD en el extremo C

- 25 La purificación de las enzimas mananasa con CBD en el extremo C se llevó a cabo utilizando cromatografía de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica. En detalle, se cultivaron *S. saccharomyces*, transformados con un plásmido que codificaba la respectiva enzima mananasa, en matraces con agitado a 30° C durante 72 horas en medio de cultivo SC-galactosa. Las células de un medio de cultivo de 5 litros se retiraron por centrifugación y el sobrenadante se sometió a concentración e intercambio de tampón (tampón A: 20 mM de Tris (hidroximetil)-aminometano, pH 8,6) por ultrafiltración utilizando una membrana con un corte de 10 kDa. Finalmente se generaron 200 ml de concentrado de mananasa en tampón A. La solución se aplicó en una columna de gel TSK SuperQ-5PW(30) de 6,3 ml (Tosoh Bioscience) equilibrada con tampón A. La columna se lavó con varios volúmenes de columna de tampón A. Posteriormente, se eluyó la enzima mananasa con un gradiente lineal desde el 0 % al 100 % de tampón B (20 mM de Tris (hidroximetil)-aminometano, pH 8,6, 1 M de NaCl) sobre 120 ml. Las muestras de proteína eluídas se analizaron por SDS PAGE. Las fracciones que contenían mananasa se agruparon, se diluyeron 1:1 con una solución de sulfato amónico 3 M y se cargaron en una columna equilibrada (tampón C: 50 mM de NaOAc, pH 5,0, 1,5 M de sulfato amónico) TSK Gel Phenyl-5PW (20) de 8,8 ml (Tosoh Bioscience). La columna se lavó con tampón C. La elución de mananasa se llevó a cabo con un gradiente lineal desde el 0 al 100 % de tampón D (50 mM de NaOAc, pH 5,0) sobre 100 ml. Las muestras de proteína eluída se analizaron por SDS PAGE. Las fracciones que contenían mananasa se agruparon y se dializaron frente al tampón D. La pureza de las muestras de mananasa se controló con una cromatografía de fase inversa utilizando una absorción a 280 nm para la detección proteica.

Ejemplo 3: Generación y caracterización de variantes de mananasa

- 45 Las variantes de mananasa se generaron utilizando diferentes procedimientos de mutagénesis del ADN que codifica las proteínas mananasa como un casete o mutagénesis por PCR u otros procedimientos de mutagénesis bien conocidos en la técnica. Los procedimientos comprenden dichos procedimientos como se desvelan en Morinaga y col., *Biotechnology* 2:646-649 (1984) y en Nelson y Long, *Analytical Biochemistry* 180:147-151(1989); o el protocolo de umbral de error de mutagénesis descrito en el documento WO 92/18645. Para la PCR mutagénica se desvela otro procedimiento adecuado en Cadwell y Joyce, *PCR Methods Appl.* 3:136-140(1994).

- 50 Las variantes de mananasa se expresaron heterológamente en uno o más de los siguientes huéspedes de expresión: *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

Ejemplo 4: Determinación de la estabilidad a la temperatura

- La estabilidad a la temperatura de las variantes de mananasa se caracteriza por sus temperaturas de inactivación. La temperatura de inactivación se determinó midiendo la actividad residual de las enzimas mananasa tras la incubación a diferentes temperaturas. Las actividades residuales se determinaron midiendo las actividades de

mananasa con y sin desafío anterior de temperatura de las muestras de mananasa. En más detalle, las muestras de mananasa se incubaron en un tampón de 50 mM de NaOAc, pH 5,0 y un 0,025 % de Triton-X-100 durante 45 min a varias temperaturas. Posteriormente se determinaron las actividades mananasa utilizando AZCL-galactomanano (carob, Megazyme) como sustrato. Para esto, se incubaron muestras de mananasa y una serie de enzimas mananasa de calibración (mananasa purificada de acuerdo con la Seq. ID No 3 con un marcador 6xHis en el extremo C) en 1 mg/ml de AZCL-galactomanano, 50 mM de NaOAc, pH 5,0 y un 0,1 % de Triton-X-100 durante 60 min a 37° C. Los sobrenadantes del ensayo en AZCL-galactomanano se transfirieron posteriormente a placas de microtitulación de 96 pocillos y se determinó la absorción a 590 nm en un lector de placas convencional. Los datos de absorción para la serie de enzimas mananasa de calibración se representaron gráficamente frente a la concentración de enzima. Las actividades de otras muestras de mananasa se calcularon utilizando ecuaciones que se generaron por el ajuste apropiado a la curva de los datos de la serie de enzimas mananasa de referencia. Por lo tanto, las actividades de las muestras de mananasa se expresan como equivalentes de actividad de la serie de enzimas de mananasa de calibración.

La temperatura de inactivación de una enzima mananasa se define como la temperatura a la que la actividad residual de la mananasa es del 50 % en comparación con la actividad residual de la misma mananasa tras la incubación en las mismas condiciones pero a temperatura ambiente. Cuando era apropiado se hicieron las extrapolaciones e interpolaciones a partir de los datos de actividad con el fin de determinar la temperatura que corresponde con el 50 % de actividad residual. Las diferencias de estabilidad a la temperatura (DT) en [°C] se calcularon restando entre ellas las temperaturas de inactivación de dos enzimas.

Tabla 3: Diferencias de estabilidad de temperatura (DT) en [°C] para las variantes de mananasa. Las variantes que se presentan se basan en la Seq. ID No 3 y tienen cada una un marcador 6xHis o el dominio de unión a carbohidratos (CBD, Seq. ID No 10, Fig. 11) en el extremo C. Las sustituciones que se presentan se introdujeron en la Seq. ID No 3. La diferencia de la estabilidad a la temperatura (DT) se define como (temperatura de inactivación de la variante) - (temperatura de inactivación de la Seq. ID No 3) teniendo ambas, la variante y la enzima con Seq. ID No 3 el marcador del extremo C idéntico. La enzima con Seq. ID No 3 que tiene el CBD en el extremo C presenta una temperatura de inactivación de 74,6° C. La enzima con Seq. ID No 3 que tiene el marcador 6xHis en el extremo C presenta una temperatura de inactivación de 75,7° C.

| Variante | marcador en el extremo C | DT / [°C] |
|---|--------------------------|-----------|
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N331S | 6xHis | 9,3 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S | 6xHis | 9,0 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 8,6 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | 6xHis | 8,5 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 8,4 |
| F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L | 6xHis | 8,2 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R | 6xHis | 8,0 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | 6xHis | 7,9 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R | 6xHis | 7,9 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173HN181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D | 6xHis | 7,8 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D/N331 S | 6xHis | 7,7 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L | 6xHis | 7,6 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 7,3 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 7,3 |
| S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R | 6xHis | 7,2 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D | 6xHis | 7,1 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D | 6xHis | 7,0 |
| F31Y/S66P/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 6,9 |
| F31Y/S66P/Q97R/N73H/V181H/A215T/Q259R/Q280L | 6xHis | 6,8 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 6,8 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 6,7 |

ES 2 575 917 T3

(continuación)

| Variante | marcador en el extremo C | DT / [°C] |
|---|--------------------------|-----------|
| F31Y/S66P/Q97R/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 6,7 |
| F31Y/S66P/Q97R/N73H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D | 6xHis | 6,5 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D | 6xHis | 6,4 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V 181A/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | 6xHis | 6,3 |
| S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D | 6xHis | 6,2 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N331S | 6xHis | 5,9 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N331 S | 6xHis | 5,9 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146QN181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | 6xHis | 5,3 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181A/A215T/Q259R | 6xHis | 5,2 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S | 6xHis | 5,0 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R | 6xHis | 5,0 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S | 6xHis | 4,7 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L | 6xHis | 4,7 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L | 6xHis | 4,6 |
| F31Y/S66P/Q97R/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 4,6 |
| S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 4,4 |
| F31Y/S66P/Q97R/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 4,4 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S | 6xHis | 4,2 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S | 6xHis | 4,1 |
| S66P/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 4,0 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N331S | 6xHis | 3,9 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 3,8 |
| S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 3,8 |
| S66P/V181H/A215T/Q259R | 6xHis | 3,7 |
| S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 3,6 |
| F31Y/S66P/N173T/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 3,2 |
| S66P/A215T/Q259R | 6xHis | 3,2 |
| F31Y/S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N344D | 6xHis | 3,1 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | CBD | 8,0 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | CBD | 6,9 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S | CBD | 6,8 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R | CBD | 6,7 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S | CBD | 6,4 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D | CBD | 6,4 |
| F31Y/S66P/Q97R/N73H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | CBD | 6,3 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R | CBD | 5,7 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S | CBD | 5,2 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | CBD | 5,2 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S | CBD | 5,1 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S | CBD | 4,3 |
| F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S | CBD | 4,0 |

Ejemplo 5: Actividad específica

La actividad específica de las enzimas mananasa se determinó utilizando las enzimas purificadas de acuerdo con los ejemplos 1 y 2. La actividad mananasa se definió como la liberación de azúcares de reducción a partir del galactomanano. La proteína mananasa se determinó por medición de la densidad óptica (DO) a 280 nm.

- 5 En detalle, las muestras de mananasa purificada se diluyeron en 50 mM de NaOAc, pH 5,0. Se añadió una solución de galactomanano carob (de baja viscosidad, Megazyme) para dar concentraciones finales de 0,7 % (p/v) de galactomanano, 50 mM de NaOAc, pH 5,0 y aproximadamente 10 µg/ml de proteína mananasa. Las soluciones se incubaron durante 16 horas a 37° C.

- 10 Posteriormente la cantidad de azúcar de reducción se determinó de la siguiente manera. Una parte del ensayo de galactomanano o soluciones de manosa definidas se mezclaron con una parte de una solución que contenían un 1 % (p/v) de ácido dinitrosalicílico (DNSA), un 30 % (p/v) de tartrato de potasio sódico y 0,4 M de NaOH. La mezcla se incubó durante 10 min a 99° C y 5 min a 4° C. Finalmente se midió la absorción a 540 nm. Los azúcares de reducción equivalentes (como equivalentes de manosa) se calcularon representando los datos de absorción de las muestras de manosa de referencia frente a la concentración de manosa. La cantidad de azúcares de reducción equivalentes para las muestras se calculó utilizando ecuaciones que se generaron por el ajuste apropiado a la curva de los datos de las muestras de manosa de referencia.

- 15 Las concentraciones de mananasa se calcularon a partir de la densidad óptica de las preparaciones a 280 nm y el respectivo coeficiente de extinción de cada variante de mananasa. Los coeficientes de extinción se calcularon basándose en la composición de aminoácidos de las proteínas de acuerdo con un procedimiento proporcionado por Gill y von Hippel, Analytical Biochemistry 182:319-326 (1989).

20 La actividad específica de las enzimas mananasa de acuerdo con la presente divulgación se expresa en nkat por mg de proteína mananasa sobre el sustrato de galactomanano carob, como se ha descrito anteriormente. Una actividad de un nkat se define como la liberación de un nanomol de azúcares de reducción por segundo.

- 25 **Tabla 4:** Actividad específica de las variantes de mananasa. Las variantes que se presentan se basan en la Seq. ID No 3 y tienen marcador 6xHis o un dominio de unión a carbohidratos (CBD, Seq. ID No 10) en el extremo C. Las sustituciones que se presentan se introdujeron en la Seq. ID No 3. Los valores de actividad específica se definen como (actividad específica de la variante) / (actividad específica de la referencia). La referencia en este caso es la mananasa de la Seq. ID No 3 con el mismo marcador en el extremo C que está presente en la variante respectiva. La referencia con el marcador 6xHis en el extremo C tiene una actividad específica de 1228 nkat/mg y la referencia con el CBD en el extremo C tiene una actividad específica de 535 nkat/mg.

| Variante | marcador en el extremo C | Actividad específica [% de la referencia] | Actividad específica [nkat/mg] |
|--|--------------------------|--|--------------------------------|
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | 6xHis | 107 | 1064 |
| S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R | 6xHis | 119 | 1184 |
| S66P/N13Y/N173H/V181H/A215T/Q259R | 6xHis | 173 | 1529 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D | 6xHis | 167 | 1482 |
| F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | CBD | 144 | 872 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | CBD | 112 | 679 |
| S66P/N13Y/N173H/V181H/A215T/Q259R | CBD | 212 | 1008 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | CBD | 141 | 756 |
| F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S | CBD | 149 | 813 |

Ejemplo 6: Estabilidad a pH bajo / pepsina

- 35 Para la determinación de la estabilidad a pH bajo / pepsina de las enzimas mananasa, se cultivó *S. saccharomyces*, transformado con un plásmido que codifica la respectiva enzima mananasa en matraces con agitado a 30° C durante 72 horas en medio de cultivo SC-galactosa. Se retiraron las células por centrifugación y el sobrenadante se separó y se concentró, por ejemplo, 10 veces por ultrafiltración con membranas con un corte de 10 kDa. Los sobrenadantes concentrados se diluyeron, por ejemplo 10 veces en una solución esterilizada por autoclave que contenía 30 g/l de agua de patata, 30 g/l de agua de macerado de maíz, 5 g/l de sulfato amónico, 15 g/l de KH₂PO₄, 10 g/l de goma de algarrobo y 20 g/l de celulosa (Avicell). Las muestras de mananasa diluidas se mezclaron 1:1 con el ensayo de

pepsina (200 mM de glicina-HCl, pH 1,5, 5 mg/ml de BSA pre-digerido con pepsina, 2 mM de CaCl₂ y 0,5 mg/ml de pepsina) y se incubaron durante 2 horas a 37° C. El pH de la mezcla era un pH de 2,45. Además se generó una muestra de control. Para esto se mezclaron las mismas muestras de mananasa diluidas 1:1 con el ensayo de control (100 mM NaOAc, pH 5,2, 5 mg/ml de BSA pre-digerido con pepsina y 2 mM de CaCl₂) y se incubaron durante 2 horas a 37° C. El pH de la mezcla era un pH de 5,2.

Para la determinación de la actividad mananasa, 1 parte de las mezclas anteriores o de una serie de enzimas mananasa de calibración (mananasa purificada de acuerdo con la Seq. ID No 3 con un marcador 6xHis en el extremo C) se mezcló con 14 partes del ensayo de AZCL-galactomanano (200 mM de NaOAc, pH 5,0, 0,1 % de Triton-X-100, 1 % de AZCL-galactomanano carob (Megazyme)) y se incubaron durante 60 min a 37° C. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron por absorción a 590 nm. Los datos de absorción para la serie de enzimas mananasa de calibración se representaron gráficamente frente a la concentración de enzima. Las actividades de las otras muestras de mananasa se calcularon utilizando ecuaciones que se generaron por el ajuste apropiado a la curva de los datos de la serie de enzima mananasa de calibración. Por lo tanto, las actividades de las muestras de mananasa se expresaron como equivalentes de actividad de la serie de enzimas mananasa de calibración.

Las actividades residuales de las enzimas mananasa se calculan según la relación siguiente:

(Actividad de mananasa tras la incubación en el ensayo de pepsina) / (actividad de mananasa tras la incubación en el ensayo de control).

Tabla 5: Estabilidad a pH bajo / pepsina de variantes de mananasa. Las variantes que se presentan se basan en la Seq. ID No 3 y tienen un dominio de unión a carbohidratos (CBD, Seq. ID No 10) en el extremo C. Las sustituciones que se presentan se introdujeron en la Seq. ID No 3. La mananasa de referencia de acuerdo con la Seq. ID No 1 con CBD en el extremo C presenta una actividad residual del 39 %.

| Variante | Marcador del extremo C | Estabilidad a pH/pepsina / [% actividad residual] |
|--|------------------------|---|
| F31Y/S66P/Q97R/N13Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | CBD | 96 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D | CBD | 74 |
| S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R | CBD | 68 |
| F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S | CBD | 75 |
| F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N73H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S | CBD | 63 |

Ejemplo 7: Comparación entre la mananasa de *Trichoderma reesei* y la variante S3R

La estabilidad a la temperatura y la producción de manosa de la mananasa de *Trichoderma reesei* que se muestra en la SEQ ID NO: 1 se comparó con la variante de mananasa derivada de la SEQ ID NO: 1 introduciendo la sustitución S3R (arginina por serina en la posición 3). El experimento y los resultados se describen en detalle en el documento WO 2008/009673 (ejemplo 8, p.100-101; Fig. 1B) y en la Fig. 10.

Listado de secuencias, texto libre

- SEQ ID NO 1: fragmento de la mananasa de *Trichoderma reesei* de tipo silvestre / aminoácidos
- SEQ ID NO 2: variante de mananasa V-31 desvelada en el documento WO 2008/009673 / aminoácidos
- SEQ ID NO 3: variante de mananasa V-31/S3R desvelada en el documento WO 2008/009673 / aminoácidos
- SEQ ID NO 4: variante de mananasa TM-1 / aminoácidos
- SEQ ID NO 5: variante de mananasa TM-1 / ADN
- SEQ ID NO 6: mananasa TM-100 / aminoácidos
- SEQ ID NO 7: variante de mananasa TM-108 / aminoácidos
- SEQ ID NO 8: variante de mananasa TM-CBD-148 / aminoácidos
- SEQ ID NO 9: variante de mananasa TM-144 / aminoácidos
- SEQ ID NO 10: CBD / aminoácidos

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> DIREVO Industrial Biotechnology GmbH
- <120> Nuevas variantes de mananasa
- <130> US61294684

ES 2 575 917 T3

<150> US 61/294684
 <151> 13-01-2010

5 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> *Trichoderma reesei*

15 <400> 1

```

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

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu
      20          25          30

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser
      35          40          45

Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln
 50          55          60

Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser
65          70          75

Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val
      85          90          95

Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn
      100          105          110

Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly
      115          120          125

Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr
      130          135          140

Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala
145          150          155          160

Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser
    
```


ES 2 575 917 T3

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser
 35 40 45
 Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln
 50 55 60
 Pro Ser Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val
 85 90 95
 Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn
 100 105 110
 Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly
 115 120 125
 Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr
 130 135 140
 Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser
 165 170 175
 Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys
 180 185 190
 Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Ser Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly
 195 200 205
 Leu Ser Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr
 210 215 220
 Asp Phe Ala Lys Asn Val Gln Ile Lys Ser Leu Asp Phe Gly Thr Phe
 225 230 235 240
 His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly
 245 250 255
 Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys
 260 265 270
 Val Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala

ES 2 575 917 T3

Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala
 145 150 155 160

Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser
 165 170 175

Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys
 180 185 190

Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Ser Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly
 195 200 205

Leu Ser Thr Gly Asp Gly Ala Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr
 210 215 220

Asp Phe Ala Lys Asn Val Gln Ile Lys Ser Leu Asp Phe Gly Thr Phe
 225 230 235 240

His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly
 245 250 255

Trp Ile Gln Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys
 260 265 270

Val Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala
 275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met
 290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser
 305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val
 325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro
 340 345 350

<210>4
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> variante de mananasa TM-1

10

<400> 4

ES 2 575 917 T3

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

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu
20 25 30

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser
35 40 45

Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln
50 55 60

Pro Pro Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser
65 70 75 80

Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val
85 90 95

Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn
100 105 110

Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly
115 120 125

Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr
130 135 140

Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala
145 150 155 160

Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser
165 170 175

Thr Asp Val Ile Val Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys
180 185 190

Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Ser Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly
195 200 205

Leu Ser Thr Gly Asp Gly Thr Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr
210 215 220

Asp Phe Ala Lys Asn Val Gln Ile Lys Ser Leu Asp Phe Gly Thr Phe
225 230 235 240

His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly
245 250 255

ES 2 575 917 T3

Trp Ile Arg Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys
 260 265 270

Val Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala
 275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met
 290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser
 305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val
 325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro
 340 345 350

<210> 5
 <211> 1056
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> variante de mananasa TM-1, ADN

10

<400>5

gcttctagat ttgtaacct atccggcacc caattcaaca tcgatggcaa agtaggctac 60
 tttgcgggca ccaactgcta ctggtgctcg ttctgacca accacgccga cgttgattcc 120
 accttagcc acatctcttc ctctggcctc aaggtagtcc gtgtatgggg cttcaacgac 180
 gtcaacacgc agccccctcc cggccagatc tggttccaga agctgtccgc tacgggggtct 240
 acgatcaaca cgggagctga tgggctgcag actctcgact acgtagtcca atcagccgag 300
 cagcacaacc tcaagctcat catcccgttc gtcaacaact ggagcgacta cggcgggata 360
 aacgcctatg tcaacgcctt tggcggcaat gcgaccacct ggtacaactaa cacggccgcg 420
 caaactcagt accgcaagta cgtccaggcc gtcgtcagcc gctacgcaa ctcgacggcc 480
 atctttgcgt gggagctggg caacgagcct cgctgcaacg ggtgcagtac tgatgtgatt 540
 gttcagtggg cgacgagtggt gtcccaatat gtcaagtcaac ttgattcgaa ccctctcgtg 600
 tctcttgag acgagggatt cggctctcagt actggagacg gcacttatcc gtatacttac 660
 ggcgagggca ctgattttgc caagaatgta caaatcaagt cgcttgactt tggactttc 720
 cacctctatc cggactcttg gggaacaaac tacacttggg gcaatggctg gattagaact 780
 catgccgccg cttgttttagc agcaggcaaa ccttgctgctc ttgaagaata cggcgcacaa 840

ES 2 575 917 T3

caaaatccct gcaccaacga ggcaccctgg caaacaacct ctctcacgac tcgcggcatg 900
 ggtggcgaca tgttttggca gtggggagac acttttgcca acggtgcccc gtogaacagt 960
 gaccctgaca ccgtctggta caactcatcg aactggcaat gcttgggtcaa gaaccacggt 1020
 gatgctatta acggcggtag aaccactcct cctccc 1056

<210>6
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> mananasa TM-100, aminoácidos

400>6

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

ES 2 575 917 T3

Thr Asp Val Ile His Gln Trp Ala Thr Ser Val Ser Gln Tyr Val Lys
 180 185 190

Ser Leu Asp Ser Asn His Leu Val Ser Leu Gly Asp Glu Gly Phe Gly
 195 200 205

Leu Ser Thr Gly Asp Gly Thr Tyr Pro Tyr Thr Tyr Gly Glu Gly Thr
 210 215 220

Asp Phe Ala Lys Asn Val Gln Ile Lys Ser Leu Asp Phe Gly Thr Phe
 225 230 235 240

His Leu Tyr Pro Asp Ser Trp Gly Thr Asn Tyr Thr Trp Gly Asn Gly
 245 250 255

Trp Ile Arg Thr His Ala Ala Ala Cys Leu Ala Ala Gly Lys Pro Cys
 260 265 270

Val Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Arg Gln Asp Pro Cys Thr Asn Glu Ala
 275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met
 290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser
 305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Ser Trp Gln Cys Leu Val
 325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro
 340 345 350

His His His His His His
 355

5

<210>7
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> variante de mananasa TM-108, aminoácidos
 <400>7

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

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu

ES 2 575 917 T3

Val Leu Glu Glu Tyr Gly Ala Gln Gln Asn Pro Cys Thr Asn Glu Ala
275 280 285

Pro Trp Gln Thr Thr Ser Leu Thr Thr Arg Gly Met Gly Gly Asp Met
290 295 300

Phe Trp Gln Trp Gly Asp Thr Phe Ala Asn Gly Ala Gln Ser Asn Ser
305 310 315 320

Asp Pro Tyr Thr Val Trp Tyr Asn Ser Ser Asn Trp Gln Cys Leu Val
325 330 335

Lys Asn His Val Asp Ala Ile Asn Gly Gly Thr Thr Thr Pro Pro Pro
340 345 350

His His His His His His
355

<210>8
<211> 410
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> variante de mananasa TM-CBD-148, aminoácidos

10

<400> 8

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

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Tyr Leu
20 25 30

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser
35 40 45

Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln
50 55 60

Pro Pro Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser
65 70 75 80

Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val
85 90 95

Arg Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn
100 105 110

Tyr Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly

ES 2 575 917 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 115 | | | | | | 120 | | | | | | 125 | | | |
| Gly | Asn | Ala | Thr | Thr | Trp | Tyr | Thr | Asn | Thr | Ala | Ala | Gln | Thr | Gln | Tyr | |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| Arg | Lys | Tyr | Val | Gln | Ala | Val | Val | Ser | Arg | Tyr | Ala | Asn | Ser | Thr | Ala | |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| Ile | Phe | Ala | Trp | Glu | Leu | Gly | Asn | Glu | Pro | Arg | Cys | His | Gly | Cys | Ser | |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| Thr | Asp | Val | Ile | His | Gln | Trp | Ala | Thr | Ser | Val | Ser | Gln | Tyr | Val | Lys | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| Ser | Leu | Asp | Ser | Asn | His | Leu | Val | Ser | Leu | Gly | Asp | Glu | Gly | Phe | Gly | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| Leu | Ser | Thr | Gly | Asp | Gly | Thr | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Tyr | Gly | Glu | Gly | Thr | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | |
| Asp | Phe | Ala | Lys | Asn | Val | Gln | Ile | Lys | Ser | Leu | Asp | Phe | Gly | Thr | Phe | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| His | Leu | Tyr | Pro | Asp | Ser | Trp | Gly | Thr | Asn | Tyr | Thr | Trp | Gly | Asn | Gly | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| Trp | Ile | Arg | Thr | His | Ala | Ala | Ala | Cys | Leu | Ala | Ala | Gly | Lys | Pro | Cys | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| Val | Leu | Glu | Glu | Tyr | Gly | Ala | Arg | Gln | Asp | Pro | Cys | Thr | Asn | Glu | Ala | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| Pro | Trp | Gln | Thr | Thr | Ser | Leu | Thr | Thr | Arg | Gly | Met | Gly | Gly | Asp | Met | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| Phe | Trp | Gln | Trp | Gly | Asp | Thr | Phe | Ala | Asn | Gly | Ala | Gln | Ser | Asn | Ser | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| Asp | Pro | Tyr | Thr | Val | Trp | Tyr | Asn | Ser | Ser | Asn | Trp | Gln | Cys | Leu | Val | |
| | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| Lys | Asn | His | Val | Asp | Ala | Ile | Asn | Gly | Gly | Thr | Thr | Thr | Pro | Pro | Pro | |
| | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| Val | Ser | Ser | Thr | Thr | Thr | Thr | Ser | Ser | Arg | Thr | Ser | Ser | Thr | Pro | Pro | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |

ES 2 575 917 T3

Pro Pro Gly Gly Ser Cys Ser Pro Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser
 370 375 380

Gly Tyr Thr Gly Pro Thr Cys Cys Ala Gln Gly Thr Cys Ile Tyr Ser
 385 390 395 400

Asn Tyr Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Asn Thr
 405 410

5 <210>9
 <211> 358
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223 variante de mananasa TM-144, aminoácidos
 <400> 9

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

Lys Val Gly Tyr Phe Ala Gly Thr Asn Cys Tyr Trp Cys Ser Phe Leu
 20 25 30

Thr Asn His Ala Asp Val Asp Ser Thr Phe Ser His Ile Ser Ser Ser
 35 40 45

Gly Leu Lys Val Val Arg Val Trp Gly Phe Asn Asp Val Asn Thr Gln
 50 55 60

Pro Pro Pro Gly Gln Ile Trp Phe Gln Lys Leu Ser Ala Thr Gly Ser
 65 70 75 80

Thr Ile Asn Thr Gly Ala Asp Gly Leu Gln Thr Leu Asp Tyr Val Val
 85 90 95

Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Leu Lys Leu Ile Ile Pro Phe Val Asn
 100 105 110

Asn Trp Ser Asp Tyr Gly Gly Ile Asn Ala Tyr Val Asn Ala Phe Gly
 115 120 125

Gly Asn Ala Thr Thr Trp Tyr Thr Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Tyr
 130 135 140

Arg Lys Tyr Val Gln Ala Val Val Ser Arg Tyr Ala Asn Ser Thr Ala
 145 150 155 160

Ile Phe Ala Trp Glu Leu Gly Asn Glu Pro Arg Cys Asn Gly Cys Ser

ES 2 575 917 T3

Val Ser Ser Thr Thr Thr Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Thr Pro Pro
1 5 10 15

Pro Pro Gly Gly Ser Cys Ser Pro Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Tyr Thr Gly Pro Thr Cys Cys Ala Gln Gly Thr Cys Ile Tyr Ser
35 40 45

Asn Tyr Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Asn Thr
50 55

REIVINDICACIONES

1. Una variante de mananasa que tiene actividad mananasa y una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia de la mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en la que la secuencia de aminoácidos de la variante de mananasa comprende las variaciones 201S, 207F y 274L, y las variaciones 66P, 215T y 259R y una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la Seq ID 1.
2. La variante de mananasa de la reivindicación 1, en la que la variante de mananasa comprende además la variación 3R.
3. La variante de mananasa de la reivindicación 1 o 2, en la que la variante de la mananasa comprende además la variación 181A/H.
4. La variante de mananasa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la variante de mananasa comprende además una o más variaciones adicionales, en la que la posición de variación es 31, 97, 113, 146, 149, 173, 181, 280, 282, 331 o 344.
5. La variante de mananasa de la reivindicación 4, en la que las variaciones son 31Y, 97R, 113Y, 146Q, 149K, 173H/T, 181H/A, 280S/L/R, 282D, 331S o 344D.
6. Una variante de mananasa que tiene actividad mananasa y una secuencia de aminoácidos que varía de la secuencia de aminoácidos de la mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), en la que los aminoácidos de la variante de mananasa comprende las variaciones 201S, 207F y 274L, y al menos variaciones seleccionadas entre el grupo que consiste en:
 - 1) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N331S
 - 2) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S
 - 3) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 - 4) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
 - 5) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 - 6) F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L
 - 7) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R
 - 8) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
 - 9) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R
 - 10) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D
 - 11) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D/N331S
 - 12) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L
 - 13) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D
 - 14) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 - 15) S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R
 - 16) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D
 - 17) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280L/N282D
 - 18) F31Y/S66P/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D
 - 19) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280L
 - 20) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 - 21) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 - 22) F31Y/S66P/Q97R/N173T/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 - 23) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D
 - 24) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D
 - 25) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
 - 26) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N282D
 - 27) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N331S
 - 28) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280R/N282D/N331S
 - 29) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
 - 30) S66P/Q97R/N113Y/N173T/V181A/A215T/Q259R
 - 31) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S
 - 32) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R
 - 33) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S
 - 34) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280L
 - 35) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L
 - 36) F31Y/S66P/Q97R/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 - 37) S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D
 - 38) F31Y/S66P/Q97R/V181H/A215T/Q259R/N282D
 - 39) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
 - 40) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
 - 41) S66P/V181H/A215T/Q259R/N282D
 - 42) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/K146Q/V181H/A215T/Q259R/Q280L/N331S

- 43) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/N282D
 44) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/N282D
 45) S66P/V181H/A215T/Q259R
 5 46) S66P/Q97R/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 47) F31Y/S66P/N173T/V181H/A215T/Q259R/N282D
 48) F31Y/S66P/N113Y/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N344D
 49) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 50) F31Y/S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
 10 51) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S
 52) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R
 53) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S
 54) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D
 55) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280R/N282D
 15 56) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R
 57) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/N331S
 58) F31Y/S66P/Q97R/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N282D/N331S
 59) S66P/N113Y/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
 60) S66P/Q97R/N113Y/N173H/V181A/A215T/Q259R/Q280S/N331S
 20 61) F31Y/S66P/Q97R/Q149K/N173H/V181H/A215T/Q259R/Q280S/N331S
 62) S66P/A215T/Q259R

y tiene una identidad de secuencia de al menos el 90 % con la Seq ID 1.

7. Una molécula de ácido nucleico, seleccionada entre el grupo que consiste en una molécula de ácido nucleico que codifica la mananasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.
- 25 9. Una célula huésped que es transformada con el vector de la reivindicación 8 y/o que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.
10. Una molécula de ácido nucleico de SEQ ID NO: 5.
11. Un procedimiento de preparación de la mananasa modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 9 y aislar la mananasa modificada a partir del cultivo.
- 30 12. Una composición que comprende las manansas modificadas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la composición comprende adicionalmente una cantidad eficaz de una o más enzimas mejoradoras del pienso o alimentos seleccionadas entre el grupo que consiste en fitasas, hemicelulasas, alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lactasas, beta-glucanasas, endo-beta-1,4-glucanasas, celulasas, xilosidasas, xilanasas, xiloglucanasas, xilano acetil-esterasas, galactanasas, exo-manansas, pectinasas, pectina liasas, pectinesterasas, poligalacturonasas, arabinasas, ramnogalacturonasas, lacasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, proteasas, amilasas, fosfatasas, enzimas lipolíticas y cutinasas.
- 35 13. Una composición que es adecuada para el procesamiento de alimentos y piensos, como suplemento de alimentos y piensos, para el blanqueamiento de pastas de papel asistido por enzimas, para la estimulación de pozos petrolíferos y de gas por fractura hidráulica, como detergente, para retirar biopelículas, o en sistemas de suministro que comprenden la mananasa modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 14. Uso de la mananasa modificada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para el procesamiento de alimentos y piensos, para la extracción a partir del café, para el procesamiento del residuo del café, como un suplemento de alimentos y piensos, para el blanqueamiento de pastas de papel asistido por enzimas, como agente blanqueador y/o de desapeste en la industria textil, para la estimulación de pozos petrolíferos y gas por fractura hidráulica, como detergente, para retirar biopelículas, en sistemas de suministro, y/o para el procesamiento de recursos renovables que se pretenden para la producción de combustibles biológicos.
- 45

FIGURA 1

Secuencia de aminoácidos de mananasa de *Trichoderma reesei* parental/de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1)

1 ASSFVTISGT QFNIDGKVGY FAGTNCYWCS FLTNHADVDS TFSHISSGL KWRVWGFND
61 VNTQPSPGQI WFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWQSAE QHNLKLIIPF VNNWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYNTAA QTQYRKYVQA WSRYANSTAIFAWELGNEP RCNGCSTDVI
181 VQWATSVSQY VKSLDSNHLV TLGDEGLGLS TGDGAYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIQT HAAACLAAGK PCVFEEYGAQ QNPCTNEAPW QTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS NWQCLVKNHV DAINGGTTTP PP

FIGURA 2

Secuencia de aminoácidos de una variante de mananasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 2)

1 ASSEVTISGT QFNIDGKVGY FAGTNCYWCS FLTNHADVDS TFSHISSGL KVVVRVWGFND
61 VNTQPSPGQI WFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWQSAE QHNLKLIIPF VNNWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYNTAA QTQYRKYVQA WSRYANSTAIFAWELGNEP RCNGCSTDVI
181 VQWATSVSQY VKSLDSNHLV SLGDEGFGLS TGDGAYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIQT HAAACLAAGK PCVLEEYGAQ QNPCTNEAPW QTTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS NWQCLVKNHV DAINGGTTTP PP

FIGURA 3

Secuencia de aminoácidos de una variante S3R de la mananasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 3)

1 ASRFVTISGT QFNIDGKVG Y FAGTNCYWCS FLTNHADVDS TFSHISSGL KWRVWGFND
61 VNTQPSPGQI WFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWQSAE QHNLKLIIPF VNNWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYTNTAA QTQYRKYVQA WSRYANSTAIFAWELGNEP RCNGCSTDVI
181 VQWATSVSQY VKSLDSNHLV SLGDEGFGLS TGDGAYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIQT HAAACLAAGK PCVLEEYGAQ QNPCTNEAPW QTTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS NWQCLVKNHV DAINGGTTTP PP

FIGURA 4

Secuencia de aminoácidos de una variante TM-1 mejorada de la mananasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 4)

1 ASRFVTISGT QFNIDGKVGY FAGTNCYWCS FLTNHADVDS TFSHISSGL KWRVWGFND
61 VNTQPPPGQI WFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWQSAE QHNLKLIIPF VNNWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYNTAA QTQYRKYVQA WSRYANSTAIFAWELGNEP RCNGCSTDVI
181 VQWATSVSQY VKSLDSNHLV SLGDEGFGLS TGDGTYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIRT HAAACLAAGK PCVLEEYGAQ QNPCTNEAPW QTTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS NWQCLVKNHV DAINGGTTTP PP

FIGURA 5

Secuencia de ácido nucleico de la variante TM-1 de mananasa (SEQ ID NO: 5)

| | | | | | | |
|------|-------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | GCTTCTAGAT | TTGTAACCAT | ATCCGGCACC | CAATTCAACA | TCGATGGCAA | AGTAGGCTAC |
| 61 | TTTGCGGGCA | CCAACTGCTA | CTGGTGCTCG | TTCCTGACCA | ACCACGCCGA | CGTTGATTCC |
| 121 | ACCTTTAGCC | ACATCTCTTC | CTCTGGCCTC | AAGGTAGTCC | GTGTATGGGG | CTTCAACGAC |
| 181 | GTCAACACGC | AGCCCCCTCC | CGGCCAGATC | TGGTTCAGAG | AGCTGTCCGC | TACGGGGTCT |
| 241 | ACGATCAACA | CGGGAGCTGA | TGGGCTGCAG | ACTCTCGACT | ACGTAGTCCA | ATCAGCCGAG |
| 301 | CAGCACAACC | TCAAGCTCAT | CATCCCGTTC | GTCAACAACCT | GGAGCGACTA | CGGCGGGATA |
| 361 | AACGCCTATG | TCAACGCCTT | TGGCGGCAAT | GCGACCACCT | GGTACACTAA | CACGGCCGCG |
| 421 | CAAACCTCAGT | ACCGCAAGTA | CGTCCAGGCC | GTCGTCAGCC | GCTACGCAA | CTCGACGGCC |
| 481 | ATCTTTGCGT | GGGAGCTGGG | CAACGAGCCT | CGCTGCAACG | GGTGCAGTAC | TGATGTGATT |
| 541 | G TTCAGTGGG | CGACGAGTGT | GTCCAATAT | GTCAAGTCAC | TTGATTGAA | CCATCTCGTG |
| 601 | TCTCTTGGAG | ACGAGGGATT | CGGTCTCAGT | ACTGGAGACG | GCACTTATCC | GTATACTTAC |
| 661 | GGCGAGGGCA | CTGATTTTGC | CAAGAATGTA | CAAATCAAGT | CGCTTGACTT | TGGTACTTTC |
| 721 | CACCTCTATC | CGGACTCTTG | GGGAACAAAC | TACACTTGGG | GCAATGGCTG | GATTAGAACT |
| 781 | CATGCCGCCG | CTTGTTTAGC | AGCAGGCAAA | CCTTGCGTGC | TTGAAGAATA | CGGCGCACAA |
| 841 | CAAATCCCT | GCACCAACGA | GGCACCTGG | CAAACAACCT | CTCTCACGAC | TCGCGGCATG |
| 901 | GGTGCGACA | TGTTTTGGCA | GTGGGAGAC | ACTTTTGCCA | ACGGTGCCCA | GTCGAACAGT |
| 961 | GACCCGTACA | CCGTCTGGTA | CAACTCATCG | AACTGGCAAT | GCTTGGTCAA | GAACCACGTT |
| 1021 | GATGCTATTA | ACGGCGGTAC | AACCACTCCT | CCTCCC | | |

FIGURA 6

Secuencia de aminoácidos de una variante TM-100 mejorada de la mananasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 6)

1 ASRFVTISGT QFNIDGKVG Y FAGTNCYWCS YLTNHADVDS TFSHISSGL KWRVWGFND
61 VNTQPPPGQI WFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWRS AE QHNLKLIIPF VNYWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYTN TAA QTQYRKYVQA WSRYANSTAI FAWELGNEP RCHGCSTDVI
181 HQWATSVSQY VKSLDSNHLV SLGDEGFGLS TGDGTYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIRT HAAACLAAGK PCVLEEYGAR QDPCTNEAPW QTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS SWQCLVKNHV DAINGGTTTP PPHHHHHH

FIGURA 7

Secuencia de aminoácidos de una variante TM-108 mejorada de la mananasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 7)

1 ASRFVTISGT QFNIDGKVGY FAGTNCYWCS FLTNHADVDS TFSHISSGL KWRVWGFND
61 VNTQPPPGQI WFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWQSAE QHNLKLIIPF VNYWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYTNTAA QTQYRKYVQA WSRYANSTAIFAWELGNEP RCHGCSTDVI
181 HQWATSVSQY VKSLDSNHLV SLGDEGFGLS TGDGTYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIRT HAAACLAAGK PCVLEEYGAQ QNPCTNEAPW QTTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS NWQCLVKNHV DAINGGTTTP PPHHHHHH

FIGURA 8

Secuencia de aminoácidos de una variante TM- CBD-148 mejorada de la mananasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 8)

1 ASRFVTISGT QFNIDGKVG Y FAGTNCYWCS YLTNHADVDS TFSHISSSGL KWRVWGFND
61 VNTQPPPGQIWFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWRS AE QHNLKLIIPF VNYWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYTN TAA QTQYRKYVQA WSRYANSTAIFAWELGNEP RCHGCSTDVI
181 HQWATSVSQY VKSLDSNHLV SLGDEGFGLS TGDGTYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIRT HAAACLAAGK PCVLEEYGAR QDPCTNEAPW QTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS NWQCLVKNHV DAINGGTTTP PVSSTTTTS
361 SRTSSTPPPP GGSCSPLYGQ CGGSGYTGPT CCAQGT CIYS NYWYSQCLNT

FIGURA 9

Secuencia de aminoácidos de una variante TM-144 mejorada de la mananasa de *Trichoderma reesei* (SEQ ID NO: 9)

1 ASRFVTISGT QFNIDGKVGY FAGTNCYWCS FLTNHADVDS TFSHISSSGL KWRVWGFND
61 VNTQPPPGQI WFQKLSATGS TINTGADGLQ TLDYWQSAE QHNLKLIIPF VNNWSDYGGI
121 NAYVNAFGGN ATTWYTNATA QTQYRKYVQA WSRYANSTA IFAWELGNEP RCNGCSTDVI
181 HQWATSVSQY VKSLDSNHLV SLGDEGFGLS TGDGTYPYTY GEGTDFAKNV QIKSLDFGTF
241 HLYPDSWGTN YTWGNGWIRT HAAACLAAGK PCVLEEYGAQ QNPCTNEAPW QTTSLTTRGM
301 GGDMFWQWGD TFANGAQSNS DPYTVWYNSS NWQCLVKNHV DAINGGTTTP PPHHHHHH

FIGURA 10

Comparación de la mananasa de *Trichoderma reesei* tipo silvestre y la variante S3R con respecto a la estabilidad térmica y la actividad

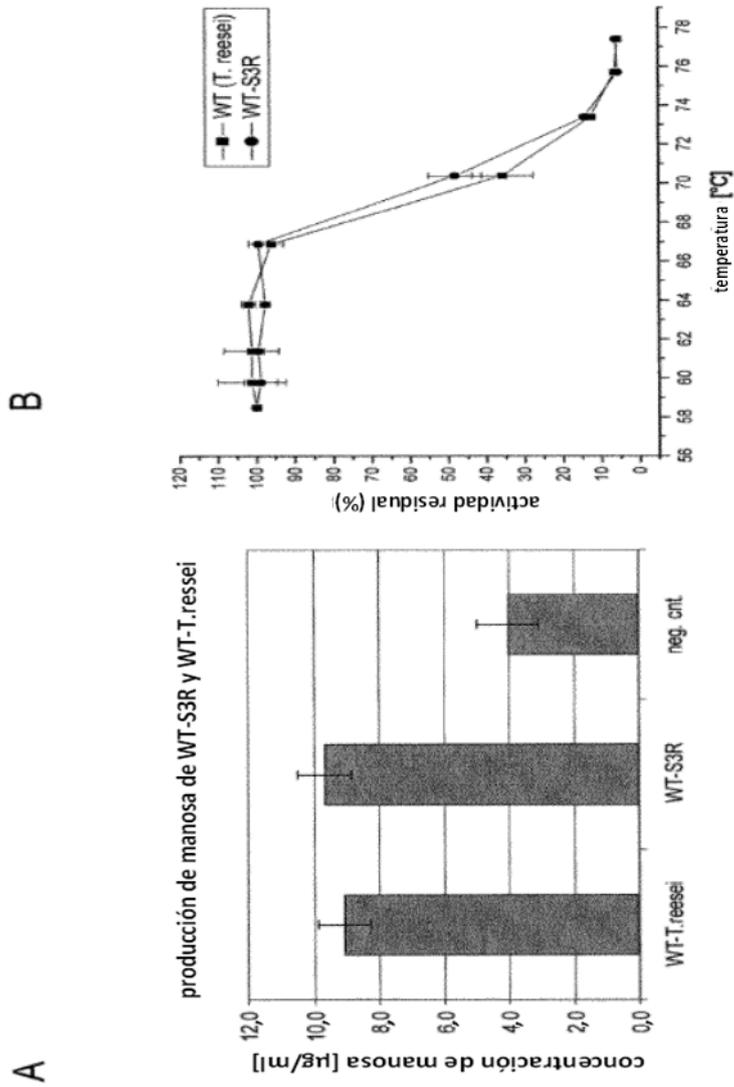


FIGURA 11

Secuencia de aminoácidos de un CBD (SEQ ID NO: 10)

Val Ser Ser Thr Thr Thr Thr Ser Ser Arg Thr Ser Ser Thr Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ser Cys
Ser Pro Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Thr Cys Cys Ala Gln Gly Thr Cys Ile Tyr
Ser Asn Tyr Trp Tyr Ser Gln Cys Leu Asn Thr