

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 792**

51 Int. Cl.:

C12N 9/42 (2006.01)

A21D 2/26 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2009** **PCT/DK2009/050352**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.07.2010** **WO10072225**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2009** **E 09834136 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2382310**

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

30 Prioridad:

23.12.2008 EP 08172755

21.01.2009 US 146170 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.02.2017

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)

Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

SIBBESEN, OLE y
SØRENSEN, JENS, FRISBÆK

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 602 792 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de xilanasa

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

El documento WO 03/020923 se refiere a variantes que tienen actividad de xilanasa. El documento de EE.UU. 6.682.923 se refiere a proteínas con actividad de xilanasa y ácidos nucleicos.

20 El documento WO 01/66711 se refiere a variantes que tienen actividad de xilanasa.

Se han realizado estudios integrales que caracterizan la funcionalidad de xilanasas en sustratos bien caracterizados y puros (Kormelink *et al.*, 1992). Estos estudios muestran que diferentes xilanasas tienen diferentes requerimientos específicos con respecto a la sustitución de la estructura de xilosa del arabinoxilano (AX). Los documentos de EE.UU. 2006/003433 y 6682923 se refieren a algunas xilanasas y polinucleótidos que codifican las xilanasas que 25 requieren tres restos de xilosa no sustituidos para hidrolizar la estructura de xilosa; otros requieren solo uno o dos. Las razones para estas diferencias en la especificidad se piensan que son debidas a la estructura tridimensional dentro de los dominios catalíticos, los cuales son a su vez dependientes de la estructura primaria de la xilanasa, es decir, de la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la traducción de estas diferencias en la secuencia de aminoácidos en diferencias en la funcionalidad de las xilanasas, hasta ahora todavía no ha sido documentada cuando la xilanasa actúa en un medio complejo, tal como materiales de plantas.

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

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

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

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

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

Todas las características mencionadas anteriormente de xilanasas usadas en diversas aplicaciones se dirigen al comportamiento de las xilanasas y son de gran importancia para lograr la funcionalidad necesitada. Sin embargo, la

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

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al sorprendente hallazgo de que es posible – mediante la modificación de un polipéptido con actividad de xilanasas en una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre 12 y 13; en combinación con una o más modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179 según se compara con la secuencia del polipéptido de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1- incrementar la solubilización del salvado y/o la actividad de xilanasas de la enzima.

En un primer aspecto la presente invención se refiere a un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos 75% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, y cuyo polipéptido tiene i) una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y ii) una o más de otras modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, en donde dichas posiciones se determinan como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación; en donde dicha modificación de aminoácido en la posición 12 y 13 es una sustitución de aminoácido a tirosina.

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

Se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos 75% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID No. 1-22, y cuyo polipéptido tiene:

i) una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y

ii) una o más de otras modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179,

en donde dichas posiciones se determinan como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación.

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

(i) preparar un polipéptido con al menos 75% identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID No. 1-22, y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácido en una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y una u otra más modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, en donde dicha posición se determina como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación;

(ii) comparar la solubilización del salvado y/o la actividad de xilanasas de dicho polipéptido con la solubilización del salvado y/o la actividad de xilanasas de la secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID NOS: 1-22 con la cual tiene el porcentaje de identidad más alto; y

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

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

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

- 5 También se describe en este documento un polipéptido con actividad de xilanasa y que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos una identidad de al menos un 75% con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID No. 1-22, y cuyo polipéptido tiene:

i) una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y

- 10 ii) una o más de otras modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179,

en donde dichas posiciones se determinan como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leyendas de las figuras

Se hace referencia en este documento a las siguientes Figuras.

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

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

Descripción detallada de la invención

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

La presente solicitud describe un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende al menos tres, tal como cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 1-22, y cuyo polipéptido tiene:

i) una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y

ii) una o más de otras modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179,

en donde dichas posiciones se determinan como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación.

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

Preferiblemente una posición de los aminoácidos particulares dentro de un polipéptido de acuerdo con la presente invención se determina por alineamiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido con SEQ ID No. 1 usando el Programa AlignX (parte del paquete del vector NTI) con parámetros estándar para múltiple alineamiento (Penalización para la inclusión de un hueco: 10 og Penalización para la extensión de un hueco 0,05). Para algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, el alineamiento puede realizarse usando la Figura 2 como se describe en este documento. A menos que se diga otra cosa, la expresión "identidad de secuencia" para aminoácidos, según se usa en este documento, se refiere a la identidad de secuencia calculada como $(n_{ref} - n_{dif}) \cdot 100 / n_{ref}$, en donde n_{dif} es el número total de restos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en donde n_{ref} es el número de restos en una de las secuencias.

Por tanto, la secuencia de aminoácidos ASTDYWQNWT tendrá una identidad de secuencia del 80% con la secuencia ASTGYWQAWT ($n_{dif}=2$ y $n_{ref}=10$).

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

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

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

La terminología para las sustituciones de aminoácidos usada en esta descripción es como sigue. La primera letra representa los aminoácidos naturalmente presentes en una posición de una particular secuencia. El siguiente número representa la posición respecto a SEQ ID No. 1. La segunda letra representa los diferentes aminoácidos que sustituyen a los aminoácidos naturales. Un ejemplo es G13F/Y113D/R122D/Q175L, en donde la glicina en la posición 13 de SEQ ID NO:1 está remplazada por una fenilalanina y la tirosina en la posición 113 de SEQ ID NO:1

está remplazada por un ácido aspártico, y la arginina en la posición 122 está remplazada por un ácido aspártico, la glutamina en la posición 175 está remplazada por una leucina, estando todas las cuatro mutaciones en el mismo polipéptido con actividad de xilanasa.

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

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

Además de los 20 aminoácidos estándar, pueden sustituirse aminoácidos no estándar (tal como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) con restos de aminoácidos de un polipéptido tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no se van a codificar por el código genético y aminoácidos no naturales pueden sustituirse con restos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" se han modificado después de la síntesis de proteínas y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferentes de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales pueden sintetizarse químicamente, y preferiblemente, están comercialmente disponibles e incluyen ácido pipecólico, ácido tiazolidina carboxílico, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

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

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

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

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

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

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

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

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

Las enzimas pueden además clasificarse según el manual de Nomenclatura Enzimática de NC-IUBMB, 1992, véase también la página web ENZYME en internet: <http://www.expasy.ch/enzyme/>. ENZYME es un repositorio de información relativo a la nomenclatura de enzimas. Se basa principalmente en las recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUB-MB) y describe cada tipo de enzima caracterizada para la que un número EC (Enzyme Commission) ha sido proporcionado (Bairoch A. "The ENZYME database", 2000, *Nucleic Acids Res* 28:304-305). Esta nomenclatura de las enzimas IUB-MB se basa en su

especificidad de sustrato y ocasionalmente en su mecanismo molecular; dicha clasificación no refleja las características estructurales de estas enzimas.

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

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

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

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

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

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

Actividades conocidas: xilanasa (EC 3.2.1.8)

Mecanismo: Retención

Nucleófilo/Base catalítico: Glu (experimental)

Donador de protones catalítico: Glu (experimental)

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

Clan: GH-C

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

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

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

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

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

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

25 En otra realización particular, la xilanasa de la invención es derivada de una xilanasa fúngica.

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

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

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

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

45 Las cuestiones que se relacionan con la taxonomía pueden resolverse consultando una base de datos de taxonomía, tal como el Navegador de Taxonomía NCBI que está disponible en el siguiente sitio de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>.

Sin embargo, se hace referencia preferiblemente a los siguientes manuales: *Dictionary of the Fungi*, 9ª edición, editada por Kirk, P.M., P. F. Cannon, J. C. David & J.A. Stalpers, CAB Publishing, 2001; y *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Segunda edición (2005).

50 Se describe en este documento también una modificación o modificaciones de una cierta o ciertas posiciones de aminoácidos. Esta posición o posiciones se listan con referencia a la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1. En la presente invención, los polipéptidos con actividad de xilanasa tienen una modificación al menos en una o dos modificaciones de aminoácido en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y una o más otras modificaciones de aminoácido en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179 comparado con la secuencia de *B. subtilis*

55

mostrada como SEQ ID No. 1. Las posiciones equivalentes en otras xilanasas de la familia 11 pueden encontrarse alineando otras xilanasas de la Familia 11 con SEQ ID No. 1 y determinando qué aminoácidos se alinean con los aminoácidos específicos de SEQ ID No. 1. Dicho alineamiento y el uso de una secuencia como primera referencia es simplemente una materia de rutina para un experto ordinario en la técnica.

- 5 En un aspecto, una variante de xilanasa descrita en este documento tiene una mejor actividad de solubilización del salvado que es mayor que la que puede obtenerse mediante el uso de la correspondiente xilanasa tipo salvaje, o cualquiera xilanasa que comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID No. 1-22, como se mide en un "ensayo de solubilización de salvado".

- 10 En un aspecto, la xilanasa descrita en este documento tiene una mejor solubilización de la actividad del salvado como resultado de la modificación en una posición seleccionada entre: 12 y 13; en combinación con una o más modificaciones de aminoácido en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179.

- 15 De forma adecuada, la actividad solubilizadora del salvado de xilanasa puede medirse usando el ensayo de solubilización de salvado proporcionado en este documento. Por tanto, pueden proporcionarse polipéptidos con mayor actividad de xilanasa y/o mayor actividad solubilizadora del salvado.

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

Ensayo de solubilización del salvado

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

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

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

- 40 En un aspecto, la xilanasa de acuerdo con la invención tiene una menor sensibilidad frente al inhibidor de xilanasa cuando se compara con cualquier xilanasa tipo salvaje, o cualquiera xilanasa que comprenda una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir de SEQ ID No. 1.

- 45 En un aspecto más, la xilanasa descrita en este documento tienen una menor sensibilidad frente al inhibidor de xilanasa como resultado de la modificación en una posición seleccionada entre: 12 y 13; en combinación con una o más modificaciones de aminoácido en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179.

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

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

- 55 McLauchlan *et al.* (1999a) describen el aislamiento y la caracterización de una proteína a partir de trigo que se une e inhibe dos xilanasas de la familia-11. De la misma forma, el documento WO 98/49278 muestra el efecto de un extracto de harina de trigo sobre la actividad de un grupo de xilanasas microbianas todas las cuales son clasificadas

como xilanasas de la familia 11. Debyser *et al.* (1999) también describen que las endoxilanasas de *Aspergillus niger* y *Bacillus subtilis*, que son ambas miembros de las xilanasas de la familia 11, se inhibían por un inhibidor de xilanasas de trigo denominado TAXI. McLauchlan *et al.* (1999b) muestran que los extractos de harinas comerciales tales como de trigo, cebada, centeno y maíz son capaces de inhibir ambas xilanasas de la familia 10 y 11.

- 5 El inhibidor de xilanasas puede ser cualquier inhibidor de xilanasas adecuado. De modo ilustrativo, el inhibidor de xilanasas puede ser el inhibidor descrito en el documento WO-A-98/49278 y/o el inhibidor de xilanasas descrito por Rouau, X. y Surget, A. (1998), McLauchlan, R., *et al.* (1999) y/o el inhibidor de xilanasas descrito en la solicitud de patente de Reino Unido número 9828599.2 (presentada el 23 de Diciembre de 1998), la solicitud de patente de Reino Unido número 9907805.7 (presentada el 6 de abril de 1999) y la solicitud de patente de Reino Unido número 9908645.6 (presentada el 15 de abril de 1999).

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

Ensayo del inhibidor de xilanasas

- 15 Preferiblemente, la actividad de inhibición de la xilanasas se mide usando el siguiente ensayo.

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

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

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

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

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

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

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

55 Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos a partir de los genes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

expresado en la ruta secretora de una célula huésped de elección, es decir, secretada dentro de un medio de cultivo, puede usarse en la presente invención.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Además, puede usarse un vector simple o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que contengan juntos el ADN total que se introduce dentro del genoma de la célula huésped, o un transposón.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La célula huésped que puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

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

En todavía un aspecto más, la célula huésped puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

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

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

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

En otro aspecto, la célula huésped filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcocroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*. Las células fúngicas se pueden transformar mediante un procedimiento que implique la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una forma conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* se describen en Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156 y el documento WO 96/00787. La levadura puede

transformarse usando los procedimientos descritos en Becker y Guarente, En Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75; 1920.

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

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

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

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

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

- 30 El polipéptido resultante puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse a partir del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales incluyendo, pero sin limitación, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. Los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbica, cromatografía por isofoco y exclusión por tamaños), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación por sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J. -C. Janson y Lars Ryden, ed., VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

En un aspecto, al menos uno, tal como dos, tal como tres, tal como cuatro modificaciones de aminoácido son una sustitución de aminoácido.

- 40 En un aspecto, todas las modificaciones de aminoácidos en el polipéptido de acuerdo con la invención son sustituciones de aminoácido.

En un aspecto, al menos uno, tal como dos, tal como tres, tal como cuatro modificaciones de aminoácido son una delección de aminoácido.

En un aspecto, todas las modificaciones de aminoácidos en el polipéptido de acuerdo con la invención son delecciones de aminoácido.

- 45 En un aspecto, al menos uno, tal como dos, tal como tres, tal como cuatro modificaciones de aminoácido son una inserción de aminoácido.

En un aspecto, todas las modificaciones de aminoácidos en el polipéptido de acuerdo con la invención son inserciones de aminoácido.

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

En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12, 13, 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, siendo determinadas la posición o las

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

5 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12F, 13Y, 15Y, 34K, 54Q, 54W, 77V, 77M, 77Y, 77L, 77S, 81I, 82I, 99Y, 104W, 110A, 113D, 113A, 114F, 114D, 114Y, 118V, 122F, 122D, 141Q, 154R, 159D, 162E, 162D, 164F, 166F, 175L, 175K, 175E, 175Y, y 179Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

10 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: G12F, G13Y, I15Y, G34K, N54Q, I77V, I77M, I77Y, I77L, I77S, V81I, V82I, K99Y, T104W, T110A, Y113D, Y113A, N114F, N114D, N114Y, I118V, R122F, R122D, N141Q, K154R, N159D, S162E, S162D, 164F, Y166F, Q175L, Q175K, Q175E, Q175Y, y S179Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención tiene al menos 76, 78, 80, 85, 90, 95, 98 o 95% de identidad con la secuencia con la cual tiene el porcentaje más alto de identidad seleccionada entre SEQ ID No. 1-22.

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

20 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es un polipéptido, en donde la una o dos modificaciones de aminoácido en una posición seleccionada entre 12 y 13 es una sustitución de aminoácido.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es un polipéptido, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 12 es una sustitución de aminoácido a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, cisteína, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, e histidina.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es un polipéptido, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 13 son una sustitución de aminoácido a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, cisteína, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, e histidina.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es un polipéptido, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 12 son una sustitución a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: fenilalanina y tirosina.

En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es un polipéptido, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 13 son una sustitución a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: fenilalanina y tirosina.

40 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención tiene un total de números de aminoácidos de menos que 250, tal como menos que 240, tal como menos que 230, tal como menos que 220, tal como menos que 210, tal como menos que 200 aminoácidos, tal como en el intervalo de 160 a 240, tal como en el intervalo de 160 a 220 aminoácidos.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 12, 13, 34, 77, 81, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166 y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

50 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12F, 13Y, 13F, 110A, 122D, 113A, 13Y, 54Q, 54W, 113D, 175L, 122F, 34K, 99Y, 104W, 141Q, 154R, 159D, 175K, 81I, 166F, 162E, 162D, 164F, 114D, 114Y, 114F, 118V, 175K, 77L, 77M, 77S, 77V, y 77Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

55 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: G12F, G13Y, G13F, N54Q, T110A, R122D, Y113A, G13Y, Y113D, Q175L, R122F, G34K, K99Y, T104W, N141Q, K154R, N159D, Q175K, V81I, Y166F, S162E, S162D, W164F, N114D, N114Y, N114F, I118V, I77L, I77M, I77S, I77V, y I77Y, siendo determinadas

la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

5 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 12, 13, 99, 104, 110, 113, 122, 141, 154, 159 y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

10 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende la sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 13 y 122, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende además una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 114 y 166, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende además una o más sustituciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 114 y 166, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

20 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en al menos cuatro de las siguientes posiciones de aminoácido: 12, 13, 99, 104, 110, 113, 114, 122, 141, 154, 159, 166, y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

25 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 13, 113, y 122, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

30 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 12, 113, y 122, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 13, 113, 122, y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

35 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12F, 13Y, 99Y, 104W, 110A, 113D, 114D, 114F, 122F, 154R, 159D, 166F, 175K, y 175L, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

40 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es un polipéptido, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácido comparado con la secuencia seleccionada entre SEQ ID No. 1-22 con la que tiene la identidad más alta.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es un polipéptido, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene al menos nueve o diez sustituciones de aminoácido.

En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención tiene actividad de solubilización de salvado.

En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención es en forma aislada.

50 El término "aislado", como se usa en este documento significa que el polipéptido está al menos sustancialmente libre de al menos un otro componente con el que la secuencia está naturalmente asociada en la naturaleza.

En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención tiene una mejor actividad de xilanasas comparado con la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1 según se mide en un ensayo de actividad de xilanasas.

- En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una mejor actividad de xilanasa como resultado de la modificación en una posición seleccionada entre 12, 13, 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una mejor actividad de solubilización del salvado comparado con la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 según se mide en un ensayo de actividad de solubilización del salvado.
- En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una mejor actividad de solubilización del salvado como resultado de la modificación en la posición seleccionada entre 12, 13, 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una menor sensibilidad respecto a un inhibidor de xilanasa.
- En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- a) 13/110/113/122/154/159/175;
 - b) 13/99/104/110/113/122/154/159/166/175;
 - c) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - d) 13/110/113/122/175;
 - e) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - f) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - g) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - h) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - i) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - j) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
 - k) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - l) 13/113/122/175;
 - m) 13/81/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - n) 13/110/113/122/164/175;
 - o) 13/110/113/122/162/175;
 - p) 13/110/113/122/175;
 - q) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - r) 13/113/122/175;
 - s) 12/113/122/175;
 - t) 13/113/122/175;
 - u) 13/34/110/113/122/175;
 - v) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
 - w) 13/99/104/113/122/175;
 - x) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;

- y) 13/99/104/110/113/118/122/154/159/175;
z) 13/15/113/122/175;
aa) 13/110/113/122/162/175;
bb) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
5 cc) 13/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
dd) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
ee) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
ff) 13/54/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
gg) 13/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175; and
10 hh) 13/54/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175;
estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- 15 a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;
c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
d) 13Y/110A/113D/122F/175L;
20 e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;
g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
25 j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;
k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
l) 13Y/113D/122D/175L;
m) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
n) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
30 o) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
p) 13Y/110A/113D/122D/175L;
q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
r) 13F/113D/122D/175L;
s) 12F/113D/122D/175L;
35 t) 13Y/113D/122F/175L;
u) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
v) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
w) 13Y/99Y/104W/113D/122D/175L;

- x) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
 - z) 13Y/15Y/113D/122D/175L;
 - aa) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L;
 - 5 bb) 13Y/775/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - dd) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - ee) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
 - ff) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
 - 10 gg) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; and
 - hh) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L;
- estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
 - b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;
 - c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
 - 20 d) 13Y/110A/113D/122F/175L;
 - e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;
 - g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
 - h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
 - 25 i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
 - j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;
 - k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - l) 13Y/113D/122D/175L;
 - m) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - 30 n) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
 - o) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
 - p) 13Y/110A/113D/122D/175L;
 - q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
 - r) 13F/113D/122D/175L;
 - 35 s) 12F/113D/122D/175L;
 - t) 13Y/113D/122F/175L;
 - u) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
 - v) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;

- w) 13Y/99Y/104W/113D/122D/175L;
x) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
z) 13Y/15Y/113D/122D/175L;
- 5 aa) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L; and
bb) 13Y/77S/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L
cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
dd) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
ee) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- 10 ff) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
gg) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; and
hh) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L;
- estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 15 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;
b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;
- 20 c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- 25 h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
l) G13Y/Y113D/R122D/Q175L;
- 30 m) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;
o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
p) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 35 r) G13F/Y113D/R122D/Q175L;
s) G12F/Y113D/R122D/Q175L;
t) G13Y/Y113D/R122F/Q175L;
u) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;

- v) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- w) G13Y/K99Y/T104W/Y113D/R122D/Q175L;
- x) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 5 z) G13Y/I15Y/Y113D/R122D/Q175L;
- aa) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L;
- bb) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
- dd) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q 175L;
- 10 ee) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/17 5L;
- ff) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q1 75L;
- gg) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q1 75L; and
- hh) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159 D/Q175L.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, que consiste en sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:

- a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;
- b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;
- c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 20 d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
- e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 25 i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- l) G13Y/Y113D/R122D/Q175L;
- m) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 30 n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;
- o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
- p) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
- q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- r) G13F/Y113D/R122D/Q175L;
- 35 s) G12F/Y113D/R122D/Q175L;
- t) G13Y/Y113D/R122F/Q175L;
- u) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;

v) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;

w) G13Y/K99Y/T104W/Y113D/R122D/Q175L;

x) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;

y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;

5 z) G13Y/I15Y/Y113D/R122D/Q175L;

aa) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L;

bb) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175

cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;

dd) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;

10 ee) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/175L;

ff) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;

gg) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L; and

hh) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L.

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa se usa para aplicaciones a gran escala.

Preferiblemente, el polipéptido que tiene actividad de xilanasa se produce en una cantidad de a partir de 1 g por litro a aproximadamente 100 g por litro del volumen de cultivo de células total después del cultivo del organismo huésped.

20 La presente invención también se refiere a una composición que comprende un polipéptido que tiene actividad de xilanasa y/o secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene actividad de xilanasa como se describe en este documento.

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

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

De acuerdo con esto, la composición de la presente invención puede usarse en combinación con otros componentes.

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

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

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

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

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

La expresión "modificador de cristales", según se usa en este documento, se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente alimenticio) que afecta a la cristalización tanto de grasa como de agua. La estabilización de cristales de hielo es importante por dos razones. El primero se relaciona directamente con la estabilidad del producto a partir de una perspectiva de separación. Cuanto más ciclos de congelación/descongelación un producto encuentre, mayor serán los cristales de hielo. Estos grandes cristales pueden romper la estructura del producto, tanto la encontrada en la naturaleza, como en el caso de las paredes celulares, o que se crean por "unión". Dado que el agua ya no se mantiene en su lugar, el producto puede exhibir sinéresis o exudación, después de la descongelación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Según se usa en este documento, la expresión "componentes adecuados para consumo animal o humano" significa un compuesto que es o puede ser añadido a la composición de la presente invención como suplemento que puede

- 5 aportar un beneficio nutricional, un sustituto de fibra o proporcionar un efecto generalmente beneficioso al consumidor. Los ingredientes pueden usarse en una amplia variedad de productos que requieran la gelificación, texturización, estabilización, suspensión, formación de películas y estructuración, retención de jugosidad, sin aportar una viscosidad innecesaria. Preferiblemente, los ingredientes podrán mejorar la vida útil y estabilidad del cultivo viable.
- De modo ilustrativo, los componentes pueden ser agentes prebióticos tales como alginato, xantano, pectina, goma de algarrobo (LBG), inulina, goma guar, galacto-oligosacárido (GOS), fructo-oligosacárido (FOS), lactosacarosa, oligosacáridos de semilla de soja, palatinosa, isomalto-oligosacáridos, gluco-oligosacáridos y xilo-oligosacáridos.
- 10 La composición de la presente invención puede usarse como - o en la preparación de - un alimento. Aquí, el término "alimento" se usa en un amplio sentido - y cubre alimentos para seres humanos así como alimentos para animales (es decir, una comida). En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano.
- El alimento puede estar en la forma de una solución o como un sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.
- 15 Cuando se usa como - o en la preparación de - un alimento - tal como un alimento funcional, la composición de la presente invención puede usarse junto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente activo.
- La composición de la presente invención puede usarse como un ingrediente de alimento.
- 20 Según se usa en este documento, la expresión "ingrediente de alimento" incluye una formulación que es o puede ser añadida a alimentos funcionales o comestibles como suplemento nutricional y/o suplemento de fibra. La expresión ingrediente de alimento, como se usa en este documento, también se refiere a formulaciones que pueden usarse a bajos niveles en una amplia variedad de productos que requieren gelificación, texturización, estabilización, suspensión, formación de películas y estructuración, retención de jugosidad y mejor sensación al paladar, sin aportarle viscosidad.
- 25 El ingrediente del alimento puede estar en forma de una solución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.
- La composición de la presente invención puede ser - o puede añadirse a - suplementos alimenticios.
- La composición de la presente invención puede ser - o puede añadirse a - alimentos funcionales.
- 30 Según se usa en este documento, la expresión "alimento funcional" significa un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutritivo y/o una satisfacción gustativa, sino que también sea capaz de suministrar un superior efecto beneficioso al consumidor.
- De acuerdo con esto, los alimentos funcionales son ordinariamente alimentos que tienen componentes o ingredientes (tales como los descritos en este documento) incorporados dentro de estos que imparten al alimento un efecto específico funcional - por ejemplo beneficio médico o fisiológico - diferente a un efecto puramente nutritivo.
- 35 Aunque no hay una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes con un interés en este área concuerdan que hay alimentos comercializados que tienen específicos efectos sobre la salud.
- Algunos alimentos funcionales son nutraceuticos. Aquí, la expresión "nutraceutico" significa un alimento que sea capaz de proporcionar no solo un efecto nutritivo y/o una satisfacción gustativa, sino que también sea capaz de suministrar un efecto terapéutico (u otro efecto beneficioso) al consumidor. Los nutraceuticos a través de las líneas de división tradicional entre alimentos y medicina.
- 40 Las encuestas han sugerido que los consumidores ponen el mayor énfasis en las reivindicaciones del alimento funcional relacionado con enfermedades cardiacas. La prevención del cáncer es otro aspecto de la nutrición que interesa a los consumidores mucho, pero sorprendentemente esta es el área que los consumidores piensan que pueden ejercer menos control. De hecho, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, al menos el 35% de los casos de cáncer están relacionados con la dieta. Además, las reivindicaciones que se relacionan con la osteoporosis, salud intestinal y efectos de obesidad son también factores clave que posiblemente van a incitar a la compra del alimento funcional y dirigir el desarrollo del mercado.
- 45 La composición de la presente invención puede usarse en la preparación de productos alimenticios tales como uno o más de: confituras, mermeladas, gelatinas, productos lácteos (tales como leche o queso), productos cárnicos, productos avícolas, productos pesqueros y productos de panadería.
- 50 De modo ilustrativo, la composición de la presente invención puede usarse como ingredientes para refrescos, zumos de frutas o una bebida que comprenda proteína de suero, té saludables, bebidas de coca, bebidas de leche y bebidas de bacterias de ácido láctico, yogurt y yogurt líquido, queso, helados de crema, helados de hielo y postres,

repostería, galletas y tortas, aperitivos, cereales para el desayuno, fideos instantáneos y *Cup Noodles*, sopas instantáneas y sopas de taza, alimentos equilibrados y bebidas, endulzantes, bocadillos de mejor textura, barras de fibra, las pastas de relleno estables al horneado, glaseados, relleno de panadería chocolate, relleno de aromatizante de tarta de queso, relleno de aromatizante de tarta de frutas, torta y glaseado de Masanut, relleno de panadería termos-estable, cremas de relleno de panadería instantánea, relleno para galletas, relleno de panadería listo para uso, relleno hipocalórico, bebida nutricional para adultos, bebida de soja/zumo acidificado, bebida de chocolate aséptico/retorta, mezclas de barras, polvos para bebidas, soja/completa suplementada con calcio y leche con chocolate, bebida de café suplementada con calcio.

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

Para ciertos aspectos, preferiblemente el comestible es una bebida.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

En una realización de la presente invención, el alimento y/o suplemento alimenticio puede combinarse con otro alimento y/o componentes alimenticios para producir un alimento basado en cereales y/o comida. Dicho otro alimento y/o componentes alimenticios pueden incluir uno o más de otros suplementos de enzimas (preferiblemente termostables), alimento con vitaminas y/o suplementos alimenticios, alimentos minerales y/o suplementos alimenticios y alimentos con aminoácidos y/o suplementos alimenticios. El alimento resultante (combinado) y/o

suplemento alimenticio que comprende posiblemente varios diferentes tipos de compuestos pueden entonces mezclarse en una cantidad apropiada con el otro alimento y/o componentes alimenticios tales como suplementos cereales y de proteínas para formar un alimento humano y/o una alimentación animal.

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

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

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

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

Procesamiento del material celulósico para la producción de bio-etanol

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

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1 - Mutagénesis dirigida de xilanasas y expresión

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

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

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

Sustrato de salvado:

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

Ensayo de solubilización del salvado:

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

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

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

Protocolo de purificación de xilanasas de *Bacillus subtilis*:

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

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

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

Modificaciones hechas a SEQ. ID N° 1	Pendiente OD/h	OD máxima	Pendiente relativa frente a BS1	OD Máx. relativa frente a BS1	Pendiente relativa frente a BS3	OD Máx. relativa frente a BS3
Ninguna (BS1)	0,23	0,68	100	100	140	140
D11F/R122D (BS3)	0,16	0,49	72	72	100	100
G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L	0,40	1,19	173	173	242	242
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;	0,39	1,18	172	172	241	241

Modificaciones hechas a SEQ. ID N° 1	Pendiente OD/h	OD máxima	Pendiente relativa frente a BS1	OD Máx. relativa frente a BS1	Pendiente relativa frente a BS3	OD Máx. relativa frente a BS3
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;	0,38	1,15	169	169	235	235
G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;	0,37	1,12	164	164	229	229
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;	0,37	1,11	162	162	226	226
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;	0,37	1,11	162	162	226	226
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K	0,35	1,05	153	153	214	214
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L	0,35	1,04	152	152	212	212
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L	0,34	1,02	149	149	208	208
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K	0,33	0,98	144	144	201	201
G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	0,31	0,93	136	136	190	190
G13Y/Y113D/R122F/Q175L	0,30	0,91	133	133	186	186
G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	0,29	0,87	128	128	178	178
G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L	0,28	0,83	121	121	169	169
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L	0,28	0,83	121	121	169	169
G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L	0,27	0,82	119	119	167	167
G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;	0,27	0,80	117	117	163	163
G13F/Y113D/R122D/Q175L	0,26	0,78	114	114	160	160
G12F/Y113D/R122D/Q175L	0,26	0,78	114	114	160	160
G13F/Y113D/R122D/Q175L	0,25	0,74	109	109	152	152
G13F/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L	0,25	0,74	108	108	150	150
G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	0,23	0,69	101	101	141	141
G13Y/K99Y/T104W/Y113D/R122D/Q175L	0,22	0,67	98	98	138	138
G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	0,22	0,67	98	98	137	137
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L	0,21	0,63	92	92	128	128
G13Y/I115Y/Y113D/R122D/Q175L	0,20	0,60	87	87	122	122
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L	0,18	0,53	78	78	109	109

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

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

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

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

Determinación de la actividad específica:

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

Ensayo del inhibidor de xilanasas

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

Cuantificación del inhibidor de xilanasas:

- 25 1 UX (Unidad de inhibidor de xilanasas) se define como la cantidad de inhibidor que decrece 1 UX de la xilanasas de XynA de *Bacillus subtilis* (Seq ID No 1) a 0,5 UX bajo las condiciones descritas más abajo.

- 30 250 ml de solución de xilanasas que contenían 12 UX/ml, aprox. 100 ml de inhibidor de solución de xilanasas y tampón McIlvaine, pH 5, para alcanzar un volumen de reacción de 1000 ml se pre-incubó durante 5 minutos a 40°C. A t = 5 minutos, 1 comprimido de Xylazyme se añade a la mezcla de reacción. A t = 15 minutos, la reacción se termina, mediante la adición de 10 ml de TRIS/NaOH al 2%, pH 12. La solución se filtra y la absorbancia del sobrenadante se mide a 590 nm. Mediante la elección de varias concentraciones diferentes de inhibidor en el ensayo anterior, es posible crear una representación de OD versus la concentración de inhibidor. Usando la pendiente (a) y el corte con el eje (b), a partir de esta representación y la concentración de la xilanasas, es posible calcular la cantidad de UX en una solución de inhibidor dada (ecuación 1).

- 35 Ecuación 1
$$UX = ((b/2)/-a)/x$$

X = Unidades de xilanasas (UX) en el ensayo

Preparación del inhibidor:

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

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

Modificaciones hechas a SEQ ID No. 1

	Actividad Especifica UX/mg	% Actividad @ 5,6 UIX/ml	% Actividad @ 33,5 UIX/ml	% Actividad @ 50 UIX/ml
Ninguna (BS1)	23,000	29		
G12F/Y113D/R122D/Q175L	19,077	100		
G13F/Y113D/R122D/Q175L	32,425	100	90	
G13F/Y113D/R122D/Q175L	34,058		86	
G13F/T110A/Y113D/R122D/Q175L	59,571		50	
G13Y/K99Y/T104W/Y113D/R122D/Q175L	35,883		80	
G13Y/I115Y/Y113D/R122D/Q175L	37,773		76	
G13Y/Y113D/R122F/Q175L	33,566			90
G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L	53,855			65
G13F/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L	15,876			97
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	47,975			72
G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	41,791			46
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L	53,331			68
G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L	54,924			32
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	54,811			64
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L	55,249			44
G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L	52,735			40
G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L	51,884			29
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L	47,445			79
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K	46,263			78
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L	42,077			79
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L	27,363			79
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L	35,906			84
G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K	46,939			79
G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	48,177			75
G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L	28,412			46

Modificaciones hechas a SEQ ID No. 1

	Actividad Específica UX/mg	% Actividad @ 5,6 UIX/ml	% Actividad @ 33,5 UIX/ml	% Actividad @ 50 UIX/ml
G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175 L	12,003			20
G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175 L	35,907			45
G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175 L	33,236			37

Ejemplo 4 - Comportamiento del horneado de los mutantes

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

Tabla 3 Receta usada para la producción de pan.

Ingredientes	Mini skala
	ml o g
Harina	50
Levadura seca	1
Sal	0,8
Azúcar	0,8
Agua	400 BU - 2%
Nota: El agua es la absorción de agua @ 400BU determinada por el análisis de harina con farinógrafo (es decir, una consistencia máxima de la masa de 400 – agua añadida de acuerdo con la determinación de la absorción de agua usando un farinógrafo de Brabender, Brabender, Alemania). Si se añaden las enzimas al donut, éstas se añaden como solución líquida y mediante la sustitución de la misma cantidad de agua.	

5 Preparación de la masa y horneado

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

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

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

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

Modificaciones hechas a Seq ID No 1	Vol. de pan @ 0,04 mg/kg de harina	Incremento de vol. relativo vs. control, %	Incremento de vol. relativo vs. BS3, %
G13Y/G34K/T110A/ Y113D/R122D/Q175L	4,22	41,89	20
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Q175K	2,90	21,93	7,54
G13Y/V81I/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,80	18,02	4,09
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Y166F/ Q175L	2,82	18,86	4,83
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/K154R/N159D/ Q175L	2,81	18,08	4,15
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/R122F/ K154R/N159D/Q175L	2,89	21,74	7,24
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162E/Q175L	2,75	13,55	1,99
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/S162D/Q175L	2,82	15,54	4,48
G13Y/T110A/Y113D/ R122D/W164F/Q175L	2,78	14,02	3,10
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,81	16,44	4,11
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,73	13,26	1,26
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114F/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,80	16,22	3,74
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/I118V/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,83	17,58	4,95
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114Y/ R122F/K154R/N159D/ Q175K	2,89	20,65	7,34
G13Y/K99Y/T104W/ T110A/Y113D/N114D/ R122F/K154R/N159D/ Q175K	2,77	14,73	2,63
G13Y/I77L/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,81	15,08	4,32
G13Y/I77M/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,70	12,43	0,17
G13Y/I77S/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,53	5,40	(6,09)
G13Y/I77V/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,60	8,19	(3,63)

Modificaciones hechas a Seq ID No 1	Vol. de pan @ 0,04 mg/kg de harina	Incremento de vol. relativo vs. control, %	Incremento de vol. relativo vs. BS3, %
G13Y/I77Y/K99Y/ T104W/T110A/Y113D/ R122F/K154R/N159D/ Q175L	2,73	13,81	1,38

Ejemplo 5 - Actividad de variantes de xilanasa en sustrato insoluble en agua *versus* sustrato insoluble.

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

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

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

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

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

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

Estructuras usadas para desarrollar nuevos variantes:

La Tabla 5 muestra las estructuras variantes de xilanasa usadas. Y5 corresponde a SEQ ID NO. 2.

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

Las mutaciones introducidas y los resultados obtenidos se ilustran en la tabla 6.

- 25 Tabla 6 Mutaciones introducidas y resultados obtenidos. Las estructuras usadas están en negrita.

Mutante	act de WU-AX	act de WE-AX	WU-AX/WE-AX
#154/N141Q	1,965	13	146
#154/N54Q/N141Q	1,611	10	159
#160/N54Q	1,203	7	161
#160/N141Q	1,785	10	175
#154/N54W/N141Q	824	7	118
#160/N54W/N141Q	1,005	6	169
Y5/S63W	918	25	36
Y5	35,550	1,487	24
#154	10,350	106	98

Mutante	act de WU-AX	act de WE-AX	WU-AX/WE-AX
#160	5,400	34	157

Todas las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva anterior se incorporan en este documento por referencia. Varias modificaciones y variaciones de los métodos descritos y el sistema de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica sin separarse del alcance y del espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención ha sido descrita en conexión con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe ser indevidamente limitada a dichas realizaciones específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son óbvias para los expertos en bioquímica y biotecnología o campos afines se pretenden que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

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

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

ASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRT
 INYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTT
 TRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQV
 MA TEGYQSSGSSNVTW

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

QCIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVTCNGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKN
 RVINFSGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDIY
 RTQRVNQPSIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVE
 GYFSSGSASITVSD

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

QTTPNSEGWHHDGYYYSWWSDGGAQATYTNLEGGTYEISWGDGGNLVGGKGWNPGLNA
 RAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLG
 KTTTRVNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTSGTVQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVA
 TEGYFSSGYARITVADVG

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

WTDAGQTVSMDLGSGGTYSTQWRNTGNFVAGKGWSTGGRKTVNYSGT FNPSGNAYLT
 LYGWTTGPLIEYYIVDNWGTYRPTGKYKGTVTSDGGTYDIYKTTRYNAPSIEGKTFTDQYW
 SVRQSKRTGGTITSGNHFDWARNGMNLGNHNYMIMATEGYQSSGSSTITV

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

MFKFKKNFLVGLSAALMSISLFSATASAASTDYWQNWTDGGGIVNAVNGSGGNYSVNW
SNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVDSWGTYR
PTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNH
VNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQSSGSSNVTW

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

MRQKKLTLLAFLVCFALTLP AEIIQAQIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGG
TFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDP
LV EYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRT
SGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISND
ESITLDKNN

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

MVSFTSLLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKRQTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVITYT
NGPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNKVINFSGSYNPNNGNSYLSVYGWSRNLPIE
YYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDIYRTQRVNQPSSIIGTATFYQYWSVRRNHRSS
GSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVEGYFSSGSASITVS

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

MVGFTPVALAALAATGALAFPAGNATELEKRQTTNSEGWHDGYYYSWWSDGGAQATYT
NLEGGTYEISWGDGGNLVGGKGWNPGLNARAIHFEGVYQPNGNSYLAVYGWTRNPLVEY
YIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLGKTTTRVNAPSIDGTQTFDQYWSVRQDKRTS
GTVQTGCHFDAWARAGLNVNGDHYYQIVATEGYFSSGYARITVADVG

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

MFKFGKKLLTVVLAASMSFGVFAATTGATDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWQ
NTGNFVVGKGWTYGTPNRVVNYNAGVFSPSGNGYLTIFYGWTRNALIEYYVDNWGTYRPT
TGTYKGTVTSDGGTYDIYTTMRYNQPSIDGYSTFPQYWSVRQSKRPIGVNSQITFQNHVN
AWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSSGSSNVTWV

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

MFKFVTKVLTVVIAATISFCLSAVPASANTYWQYWTDGGGTVNATNGPGGNYSVTWRDT
GNFVVGKGWEIGSPNRTIHYNAGVWEPSPNGYLTLYGWTRNQLIEYYVDNWGTYRPTG
THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDGTQTFQFWSVRQSKRPTGNNVSITFSNHVNA
WRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSGRSNVTWV

10

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

MRQKKLTFILAFLVCFALTLP AEIIQAQIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGG
TFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDP
LV EYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRT
SGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMYEVALTVEGYQSSGSANVYSNTRLRINGNPLSTISND
KSITLDKNN

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

MFKFKKKFLVGLTAAFMISMFSATASAAGTDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNW
SNTGNFVVGKGWTTGSPERTINYNAGVWAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVDSWGTYR

PTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTRYNAPSIDGDNTTFTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNH
VNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYKSSGSSNVTW

Seq ID No 13 (gi|42688917|gb|AAS3173s.1| Secuencia 14 de la patente de EE.UU. 6682923):

MNLRLRLLFVMCIGLTLILTAVPAHARTITNNEMGNHSGYDYELWKDYGNTSMTLNNGG
AFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRTHHQLGNISINYNASFNPGGNSYLCVYGWWTQSPLAE
YYIVDSWGTYRPTGAYKGSFYADGGTYDIYETTRVNQPSIIGIATFKQYWSVRQTKRTSGT
VSVSAHFRKWESLGMPMGKMYETAFTVEGYQSSGSANVMTNQLFIGN

5

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

MKLFLAAIVLCATAATAFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYSFWTNGGGEVTY
TNGDNGEYSVTWVDCGDFTSKGKGNPANAQTVTYSGEFNPSGNAYLAVYGWTTDPLVE
YYILES YGTYNPSSGLTSLGQVTS DGGTYDIYSTQRVNQP SIEGTSTFNQYWSVRTEKRVG
GTVTTANHFAAWKALGLEMGTYNYMIVSTEGYESSGSSTITVS

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

QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQT
HQOVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDPLEYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVD
GGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRTSGTISVSNHFRAWENLGMNMGKMY
EVALTVEGYQSSGSANVYSNTLRINGNPLSTISNDESITLDKNN

10

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

QTIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVTYTNPGGQFSVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKN
KVINFGSYNPNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGEVTS DGSVYDIY
RTQRVNQP SIIGTATFYQYWSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTLGTMDYQIVAVE
GYFSSGSASITVS

Seq ID No 17 (gi|176059070|emb|CA330753.1| producto proteico no nombrado [*Paenibacillus pabuli*]):

TDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWQNTGNFVVGKGWTYGTPNRVVNYNAGVF
SPSGNGYLTIFYGWTRNALIEYYVDN WGTYRPTGTYKGTVTSDGGTYDIYTTRYNQP SI
DGYSTFPQYWSVRQSKRPIGVNSQITFQNHVNAWASKGMYLGNSWSYQVMATEGYQSS
GSSNVTW

Seq ID No 18 (gi|74197761|emb|CAJ29666.1| producto proteico no nombrado [*Bacillus halodurans*]):

NTYWQYWTDDGGGTVNATNGPGGNYSVTWRDTGNFVVGKGWEIGSPNRTIHYNAGVWE
PSGNGYLTLYGWTRNQLIEYYVVDNWGTYRPTGTHRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSID
GTQTFQQFWSVRQSKRPTGNNVSITFSNHVNAWRNAGMNLGSSWSYQVLATEGYQSSG
RSNVTVW

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

QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGTMILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQT
HQQVGNMSINYGANFQPNGNAYLCVYGWTVDPLEYYIVDSWGNWRPPGATPKGTITVD
GGTYDIYETLRVNQPSIKGIATFKQYWSVRRSKRTSGTISVSNHFWENLGMNMGKMY
EVALTVEGYQSSGSANVYSNTLRINGNPLSTISNDKSITLDKNN

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

AGTDYWQNWTDGGGTVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGV
WAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPS
IDGDNTTFTQYWSVRQSKRPTGSNAAITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVLATEGYK
SSGSSNVTW

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

RTITNNEMGNHSGYDYELWKDYGNTSMTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRT
HHQLGNISINYNASFNPGGNSYLCVYGWTSPLAEYYIVDSWGTYRPTGAYKGSFYADGG
TYDIYETTRVNQPSIIGIATFKQYWSVRQTKRTSGTVSVSAHFRKWESLGMPMGKMYETA
FTVEGYQSSGSANVMTNQLFIGN

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

AFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNGYYYSFWTNGGGEVITYTNGDNGEYSVTWVD
CGDFTSGKGWNPNANAQTVTYSGEFNPNGNAYLAVYGWTTDPLVEYYILES YGTYNPSSGL
TSLGQVTSDDGGTYDIYSTQRVNQPSTIEGTSTFNQYWSVRTEKRVGGTVTTANHFAAWKA
LGLEMGTYNMIVSTEGYESSGSSTITVS

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

ASTDYWQNWTFGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKGWTTGSPFRTINYNAGV
WAPNGNGYLTLYGWTRSPLIEYYVVDSWGTYRPTGTYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPS
IDGDDTTFTQYWSVRQSKRPTGSNATITFSNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQVMATEGYQ
SSGSSNVTW

- 15 La Seq ID No 24 muestra la secuencia de la secuencia del inhibidor de xilanasa de trigo madura:

MPPVLLLVLAAASLVALPSCQSLPVLAPVTKDPATSLYTI PFHDGASLVLDVAGPLVWSTCDG
 GQPPAEIPCSSPTCLLANAYPAPGCPAPSCGSDKHDKPCTAYPYNPVSGACAAGSLSHTRF
 VANTTDGSKPVSKVNVGVLAACAPSKLLASLPRGSTGVAGLANSGLALPAQVASAQKVAN
 RFLCLPTGGPGVAIFGGGPVPWPQFTQSMPTPLVTGGSPAHYISARSIVVDTRVPVP
 EGALATGGVMLSTRLPYVLLRPDVYRPLMDAFTKALAAQHANGAPVARAVEAVAPFGVCY
 DTKTLGNNLGGYAVPNVQLGLDGGSDWTMTGKNSMVDVKQGTACVAFVEMKGVAAGD
 GRPAVILGGAQMEDFVLD FDM EKRLGFSRLPHFTGCGGL

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

ASTDWWENWTIGGGIVNAVNGSGGNYSVNWSNTGNFDVAKGWTTGSPFRTINYNAGV
 WAPNGWGELELYGWTRSPLIEYLVD SWGTNRPTGTYKGT VKSDGGTYDIYT DTRYNYP
 SEDGDRTTMTQYSSVRQSKRPTGSNATITFTNHVNAWKSHGMNLGSNWAYQDMATEGY
 QSSGSSNVTWV

Realizaciones descritas en este documento:

- 5 1. Un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos 75% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1-22, y cuyo polipéptido tiene
 - i) una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y
 - 10 ii) una o más de otras modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179,

en donde dichas posiciones se determinan como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación.
- 15 2. Un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos 75% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID No. 1-22, y cuyo polipéptido tiene:
 - iii) una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y
 - iv) una o más de otras modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 34, 77, 81, 82, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 159, 162, 164, 166, y 175;

en donde dichas posiciones se determinan como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación.
- 20 3. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 ó 2, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12, 13, 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 25 4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-2, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12F, 13Y, 15Y, 34K, 77V, 77M, 77Y, 77L, 77S, 81I, 82I, 99Y, 104W, 110A, 113D, 113A, 114F, 114D, 114Y, 118V, 122F, 122D, 154R, 159D, 162E, 162D, 164F, 166F, 175L, 175K, 175E, 175Y, y 179Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 30 5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-3, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: G12F, G13Y, I15Y, G34K, I77V, I77M, I77Y, I77L, I77S, V81I, V82I, K99Y, T104W, T110A, Y113D, Y113A, N114F, N114D, N114Y, I118V, R122F, R122D, K154R, N159D, S162E, S162D, 164F, Y166F, Q175L, Q175K, Q175E, Q175Y, y S179Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 35

6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-4, en donde dicho polipéptido tiene al menos 76, 78, 80, 85, 90, 95, 98 o 95% de identidad con la secuencia con la cual tiene el porcentaje más alto de identidad seleccionada entre SEQ ID No. 1-22.
7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-5, que tiene un plegamiento β enrollado.
- 5 8. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-6, en donde la una o dos modificaciones de aminoácido en una posición seleccionada entre 12 y 13 es una sustitución de aminoácido.
9. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-7, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 12 es una sustitución de aminoácido a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, cisteína, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, e histidina.
- 10 10. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-8, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 13 son una sustitución de aminoácido a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: isoleucina, alanina, leucina, asparagina, lisina, ácido aspártico, metionina, cisteína, fenilalanina, ácido glutámico, treonina, glutamina, triptófano, valina, prolina, serina, tirosina, arginina, e histidina.
- 15 11. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-9, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 12 son una sustitución a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: fenilalanina y tirosina.
12. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-10, en donde las modificaciones de aminoácido en la posición 13 son una sustitución a cualquier resto de aminoácido diferente seleccionado entre el grupo que consiste en: fenilalanina y tirosina.
- 20 13. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-11 que tiene un total de números de aminoácidos de menos que 250, tal como menos que 240, tal como menos que 230, tal como menos que 220, tal como menos que 210, tal como menos que 200 aminoácidos, tal como en el intervalo de 160 a 240, tal como en el intervalo de 160 a 220 aminoácidos.
- 25 14. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-12, que comprende una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 12, 13, 34, 77, 81, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166 y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 30 15. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-13, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12F, 13Y, 13F, 110A, 122D, 113A, 13Y, 113D, 175L, 122F, 34K, 99Y, 104W, 154R, 159D, 175K, 81I, 166F, 162E, 162D, 164F, 114D, 114Y, 114F, 118V, 175K, 77L, 77M, 77S, 77V, y 77Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 35 16. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-14, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en:
G12F, G13Y, G13F, T110A, R122D, Y113A, G13Y, Y113D, Q175L, R122F, G34K, K99Y, T104W, K154R, N159D, Q175K, V81I, Y166F, S162E, S162D, W164F, N114D, N114Y, N114F, I118V, 177L, I77M, I77S, I77V, y I77Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 40 17. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-15, que comprende una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 12, 13, 99, 104, 110, 113, 122, 141, 154, 159 y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 45 18. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-16, que comprende la sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 13 y 122, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
19. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 16-17, que comprende además una o más modificaciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 114 y 166, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 50 20. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 16-17, que comprende además una o más sustituciones en una cualquiera o más de las posiciones de aminoácido: 114 y 166, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.

21. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-17, que comprende una sustitución o sustituciones en al menos cuatro de las siguientes posiciones de aminoácido: 12, 13, 99, 104, 110, 113, 114, 122, 141, 154, 159, 166, y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 5 22. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20, que comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 13, 113, y 122, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
23. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-20, que comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 12, 113, y 122, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 10 24. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-21, que comprende una sustitución o sustituciones en las posiciones de aminoácido: 13, 113, 122, y 175, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
25. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-23, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 12F, 13Y, 99Y, 104W, 110A, 113D, 114D, 114F, 122F, 154R, 159D, 166F, 175K, y 175L, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 15 26. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-24, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene al menos cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácido comparado con la secuencia seleccionada entre SEQ ID No. 1-22 con la que tiene la identidad más alta.
- 20 27. El polipéptido de acuerdo con la realización 25, en donde la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido tiene al menos nueve o diez sustituciones de aminoácido.
28. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-26, que tiene actividad de solubilización de salvado.
- 25 29. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-27 en forma aislada.
30. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-28, que tiene una mejor actividad de xilanasa comparado con la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1 según se mide en un ensayo de actividad de xilanasa.
- 30 31. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-29, que tiene una mejor actividad de xilanasa como resultado de la modificación en una posición seleccionada entre 12, 13, 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
32. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-30, que tiene una mejor actividad de solubilización del salvado comparado con la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1 según se mide en un ensayo de actividad de solubilización del salvado.
- 35 33. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-31, que tiene una mejor actividad de solubilización del salvado como resultado de la modificación en la posición seleccionada entre 12, 13, 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de B. subtilis mostrada como SEQ ID No. 1.
- 40 34. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-32, que tiene una menor sensibilidad respecto a un inhibidor de xilanasa.
35. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-33, en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende modificaciones en las posiciones seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- 45 a) 13/110/113/122/154/159/175;
- b) 13/99/104/110/113/122/154/159/166/175;
- c) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
- d) 13/110/113/122/175;
- 50 e) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;

- f) 13/99/104/110/113/122/154/159/175;
g) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
h) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
i) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
5 j) 13/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
k) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
l) 13/113/122/175;
m) 13/81/99/104/110/113/122/154/159/175;
n) 13/110/113/122/164/175;
10 o) 13/110/113/122/162/175;
p) 13/110/113/122/175;
q) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
r) 13/113/122/175;
s) 12/113/122/175;
15 t) 13/113/122/175;
u) 13/34/110/113/122/175;
v) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
w) 13/99/104/113/122/175;
x) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
20 y) 13/99/104/110/113/118/122/154/159/175;
z) 13/15/113/122/175;
aa) 13/110/113/122/162/175;
bb) 13/77/99/104/110/113/122/154/159/175;
cc) 13/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
25 dd) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
ee) 13/54/99/104/110/113/122/141/154/159/175;
ff) 13/54/99/104/110/113/114/122/154/159/175;
gg) 13/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175; and
hh) 13/54/99/104/110/113/114/122/141/154/159/175;
30 estando determinada la(s) posición(ones) como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
36. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-34, en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:
- 35 a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;
c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
d) 13Y/110A/113D/122F/175L;

- e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;
- g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
- h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
- 5 i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
- j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;
- k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- l) 13Y/113D/122D/175L;
- m) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- 10 n) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
- o) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
- p) 13Y/110A/113D/122D/175L;
- q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- r) 13F/113D/122D/175L;
- 15 s) 12F/113D/122D/175L;
- t) 13Y/113D/122F/175L;
- u) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
- v) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- w) 13Y/99Y/104W/113D/122D/175L;
- 20 x) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
- z) 13Y/15Y/113D/122D/175L;
- aa) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L;
- bb) 13Y/77S/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- 25 cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- dd) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- ee) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- ff) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
- gg) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; and
- 30 hh) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L;

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

37. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-35, en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que
- 35 consiste en:

- a) 13Y/110A/113D/122D/154R/159D/175L;
- b) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/166F/175L;
- c) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;

- d) 13Y/110A/113D/122F/175L;
- e) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- f) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175K;
- g) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175K;
- 5 h) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175L;
- i) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114D/122F/154R/159D/175L;
- j) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114Y/122F/154R/159D/175K;
- k) 13Y/77L/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- l) 13Y/113D/122D/175L;
- 10 m) 13Y/81I/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- n) 13Y/110A/113D/122D/164F/175L;
- o) 13Y/110A/113D/122D/162D/175L;
- p) 13Y/110A/113D/122D/175L;
- q) 13Y/77Y/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- 15 r) 13F/113D/122D/175L;
- s) 12F/113D/122D/175L;
- t) 13Y/113D/122F/175L;
- u) 13Y/34K/110A/113D/122D/175L;
- v) 13Y/77V/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- 20 w) 13Y/99Y/104W/113D/122D/175L;
- x) 13Y/77M/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L;
- y) 13Y/99Y/104W/110A/113D/118V/122F/154R/159D/175L;
- z) 13Y/15Y/113D/122D/175L;
- aa) 13Y/110A/113D/122D/162E/175L; and
- 25 bb) 13Y/77S/99Y/104W/110A/113D/122F/154R/159D/175L
- cc) 13Y/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- dd) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- ee) 13Y/54W/99Y/104W/110A/113D/122F/141Q/154R/159D/175L;
- ff) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/154R/159D/175L;
- 30 gg) 13Y/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L; and
- hh) 13Y/54Q/99Y/104W/110A/113D/114F/122F/141Q/154R/159D/175L;

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

- 38. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-36, en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, que comprende sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:

- a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;
- b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;

- c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
- e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- 5 g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
- k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- 10 l) G13Y/Y113D/R122D/Q175L;
- m) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;
- o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
- p) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
- 15 q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- r) G13F/Y113D/R122D/Q175L;
- s) G12F/Y113D/R122D/Q175L;
- t) G13Y/Y113D/R122F/Q175L;
- u) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
- 20 v) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- w) G13Y/K99Y/T104W/Y113D/R122D/Q175L;
- x) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/I118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- z) G13Y/I15Y/Y113D/R122D/Q175L;
- 25 aa) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L;
- bb) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
- cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
- dd) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q 175L;
- ee) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/17 5L;
- 30 ff) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q1 75L;
- gg) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q1 75L; and
- hh) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159 D/Q175L.

39. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-37, en donde dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1, que consiste en sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de la lista que consiste en:

- a) G13Y/T110A/Y113D/R122D/K154R/N159D/Q175L;
- b) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Y166F/Q175L;

- c) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
d) G13Y/T110A/Y113D/R122F/Q175L;
e) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
f) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
5 g) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175K;
h) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175L;
i) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
j) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114Y/R122F/K154R/N159D/Q175K;
k) G13Y/I77L/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
10 l) G13Y/Y113D/R122D/Q175L;
m) G13Y/V81I/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
n) G13Y/T110A/Y113D/R122D/W164F/Q175L;
o) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162D/Q175L;
p) G13Y/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
15 q) G13Y/I77Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
r) G13F/Y113D/R122D/Q175L;
s) G12F/Y113D/R122D/Q175L;
t) G13Y/Y113D/R122F/Q175L;
u) G13Y/G34K/T110A/Y113D/R122D/Q175L;
20 v) G13Y/I77V/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
w) G13Y/K99Y/T104W/Y113D/R122D/Q175L;
x) G13Y/I77M/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175L;
y) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/1118V/R122F/K154R/N159D/Q175L;
z) G13Y/I15Y/Y113D/R122D/Q175L;
25 aa) G13Y/T110A/Y113D/R122D/S162E/Q175L;
bb) G13Y/I77S/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/K154R/N159D/Q175
cc) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
dd) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/N141Q/K154R/N159D/Q175L;
ee) G13Y/N54W/K99Y/T104W/T110A/Y113D/R122F/141Q/K154R/N159D/175L;
30 ff) G13Y/N54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/K154R/N159D/Q175L;
gg) G13Y/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/Q175L; and
hh) G13Y/54Q/K99Y/T104W/T110A/Y113D/N114F/R122F/141Q/K154R/N159D/ Q175L.
40. Un método para identificar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38, comprendiendo dicho método:
- 35 (i) preparar un polipéptido con al menos 75% identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre SEQ ID No. 1-22, y cuyo polipéptido tiene una modificación de aminoácido en una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y una u otra más modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y

179, en donde dicha posición se determina como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación;

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

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

41. Un método para preparar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38, comprendiendo dicho método expresar una secuencia de nucleótidos que codifica a dicho polipéptido; y opcionalmente aislar y/o purificar el polipéptido después de la expresión.

42. El método de acuerdo con cualquiera de la realización 40, en donde dicho polipéptido se prepara modificando tanto una secuencia de aminoácidos del polipéptido en la posición seleccionada entre 12 y 13, como en un códon que codifica un resto de aminoácido en la posición seleccionada entre 12 y 13 en una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos del polipéptido, en donde las posiciones seleccionadas entre 12 y 13 se determinan con referencia a la secuencia de xilanasa de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.

43. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 38.

44. Un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42.

45. Una célula que se ha transformado con la secuencia de nucleótidos de la realización 42 o el vector de la realización 43.

46. Un organismo huésped que se ha transformado con la secuencia de nucleótidos de la realización 42 o el vector de la realización 43.

47. Una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico.

48. Una masa que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 46.

49. Un producto de panadería que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 46 o una masa de acuerdo con la realización 47.

50. Una alimentación animal que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 46.

51. Una composición de limpieza que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41.

52. Un método para degradar o modificar una pared celular de la planta, cuyo método comprende poner en contacto dicha pared celular de las plantas con el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 46.

53. Un método para procesar materiales de plantas cuyo método comprende poner en contacto dichos materiales de plantas con el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 46.
54. El uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 46 en un método para modificar materiales de plantas.
55. El uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1-38 o un polipéptido identificado de acuerdo con la realización 39 o un polipéptido preparado de acuerdo con las realizaciones 40-41 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la realización 42 o el vector de acuerdo con la realización 43 o la célula de acuerdo con la realización 44 o el organismo de acuerdo con la realización 45 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la realización 46 en uno cualquiera o más independientemente seleccionado de: horneado, procesamiento de cereales, licuefacción de almidón, producción de bio-etanol a partir de material celulósico, alimentación animal, en el procesamiento de madera y en el potenciamiento del blanqueamiento de la pulpa de madera, y como una composición de limpieza.
56. Un polipéptido o su fragmento sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.
57. Un método sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.
58. Una composición sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.
59. Un uso sustancialmente como se describe en este documento anteriormente con referencia a los Ejemplos y dibujos.

Referencias

- Collins, T., Gerday, C. and Feller, G. (2005) FEMS Microbiol Rev., 29 (1), 3-23.
- Courtin, C., Roelants, A. and Delcour, J. (1999). Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanases in bread-making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47. 1870-1877.
- Coutinho, P.M. and Henrissat, B. (1999) Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/>.
- D'Appolonia, B.L. and MacArthur, L.A. (1976). Comparison of bran and endosperm pentosans in immature and mature wheat. *Cereal Chem.* 53. 711 - 718.
- Debyser, W. and Delcour, J. A. (1998). Inhibitors of cellolytic, xylanolytic and β -glucanolytic enzymes. WO 98/49278.
- Hazlewood, G. P. and Gelbert, H. J. (1993). Recombinant xylanases. PCT application. WO 93/25693.
- Henrissat, B. (1991) *Biochem. J.* 280, 309-316.
- Ingelbrecht, J. A., Verwimp, T. and Delcour, J. A. (1999). Endoxylanases in durum wheat semolina processing: solubilisation of arabinoxylans, action of endogenous inhibitors and effects on rheological properties. *J. Agri. Food Chem.*
- Jacobsen, T. S., Heldt-Hansen, H. P., Kofod, L. V., Bagger, C. and Müllertz, A. (1995). Processing plant material with xylanase. PCT application. WO 95/23514.
- Kormelink, F. J. M. (1992). Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Holland (175 pp., English and Dutch summaries).
- Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*. 47, 273-279.
- McLauchlan, R., Garcia-Conesa, M. T., Williamson, G., Roza, M., Ravestien, P. and MacGregor, A. W. (1999a). A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochem. J.* 338, 441-446.
- McLauchlan, R, Flatman, R et al (1999) Poster Presentation from meeting at University of Newcastle (1999) April 11th-April 17th. Xylanase inhibitors, a novel class of proteins from cereals.

Montgomery, R. and Smith, F. (1955). The Carbohydrates of the Gramineae. VIII. The constitution of a water soluble hemicellulose of the endosperm of wheat (*Triticum vulgare*). J. Am. Chem. Soc. 77. 3325 - 3328.

Paice, M.G., Bourbonnais, R., Desrochers, M., Jurasek, L. and Yaguchi, M. (1986): A Xylanase Gene from *Bacillus subtilis*: Nucleotide Sequence and Comparison with *B. pumilus* Gene. Arch. Microbiol. 144, 201-206.)

- 5 Rouau, X. (1993). Investigations into the effects of an enzyme preparation from baking on wheat flour dough pentosans. J. Cereal Science. 18. 145-157.

Rouau, X., El-Hayek, M-L. and Moreau, D. (1994). Effect of an enzyme preparation containing pentosanases on the bread-making quality of flour in relation to changes in pentosan properties. J. Cereal Science. 19. 259-272.

- 10 Slade, L., Levine, H., Craig, S., Arciszewski, H. and Saunders, S. (1993). Enzyme treated low moisture content comestible products. US 5200215 by Nabisco.

Soerensen, J.F. and Sibbesen, O. (1999). Bacterial xylanase. UK A 9828599.2.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido con actividad de xilanasas y que comprende una secuencia de aminoácidos, teniendo dicha secuencia de aminoácidos al menos 75% de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID No. 1, y cuyo polipéptido tiene:
 - 5 i) una o dos modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 12 y 13; y
 - ii) una o más de otras modificaciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre: 15, 34, 54, 77, 81, 82, 99, 104, 110, 113, 114, 118, 122, 141, 154, 159, 162, 164, 166, 175, y 179,
 en donde dichas posiciones se determinan como la posición correspondiente a la posición de la secuencia de xilanasas de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1 por alineación; en donde dichas modificaciones de aminoácidos en la posición 12 y 13 es una sustitución de de aminoácido a tirosina.
- 10 2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 13Y, 15Y, 34K, 77V, 77M, 77Y, 77L, 77S, 81I, 82I, 99Y, 104W, 110A, 113D, 113A, 114F, 114D, 114Y, 118V, 122F, 122D, 154R, 159D, 162E, 162D, 164F, 166F, 175L, 175K, 175E, 175Y, y 179Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 15 3. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde dicho polipéptido tiene al menos 80, 85, 90, 95, o 98 de identidad con la secuencia con la cual tiene el porcentaje más alto de identidad seleccionada a partir de SEQ ID No. 1.
4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que tiene un plegamiento β -enrollado.
- 20 5. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que tiene un número total de aminoácidos de menos de 250, tal como menos de 240, tal como menos de 230, tal como menos de 220, tal como menos de 210, tal como menos de 200 aminoácidos, tal como en el intervalo de 160 a 240, tal como en el intervalo de 160 a 220 aminoácidos.
- 25 6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre el grupo que consiste en: 13Y, 110A, 122D, 113A, 13Y, 113D, 175L, 122F, 34K, 99Y, 104W, 154R, 159D, 175K, 81I, 166F, 162E, 162D, 164F, 114D, 114Y, 114F, 118V, 175K, 77L, 77M, 77S, 77V, y 77Y, siendo determinadas la posición o las posiciones como la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de *B. subtilis* mostrada como SEQ ID No. 1.
- 30 7. Un método para preparar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo dicho método expresar una secuencia de nucleótidos que codifica a dicho polipéptido; y opcionalmente aislar y/o purificar el polipéptido después de la expresión.
8. Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 35 9. Una composición que comprende el polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un polipéptido preparado de acuerdo con la reivindicación 7 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8 en mezcla con un componente no tóxico.
10. El uso del polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o un polipéptido preparado de acuerdo con la reivindicación 7 o la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 8 en mezcla con un componente no tóxico o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 en un método para modificar materiales de plantas.

40

Figura 1



Figura 2

		1	60
1	(1)	-----ASTDYWQNWTDGGGIVN	
10	(1)	-----MFKFVTKVLTVVIAATISFCLSAVPAS--ANTYWQYWTDGGGTVN	
18	(1)	-----NTYWQYWTDGGGTVN	
11	(1)	-----MRQKKLTFILAFVLCFALTLP AEIIQAQIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
6	(1)	-----MRQKKLTLILAFVLCFALTLP AEIIQAQIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
15	(1)	-----QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
19	(1)	-----QIVTDNSIGNHDGYDYEFWKDSGGSGT	
13	(1)	-----MNLRLKRLLFVMCIGLTLILTAVPAHARTITNNEMGNHSGDYELWKDYG-NTS	
21	(1)	-----RTITNNEMGNHSGDYELWKDYG-NTS	
14	(1)	MKLFLAAIVLCATAATAFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNNGYYSFWTNGGGEVT	
22	(1)	-----AFPSELAQRAAGDLSKRQSITTSQTGTNNNGYYSFWTNGGGEVT	
16	(1)	-----Q-TIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVT	
7	(1)	-MVSFTSLLAASPPSRASCRPAAEVESVAVEKRQ-TIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVT	
2	(1)	-----Q-CIQPGTGYNNGYFYSYWNDGHGGVT	
3	(1)	-----Q-TTPNSEGWHDGYYSWWSGDGAQAT	
8	(1)	--MVGFTPVALAALAATGALAFPAGNATELEKRQ-TTPNSEGWHDGYYSWWSGDGAQAT	
4	(1)	-----WTDAGQTVS	
17	(1)	-----TDYWQNWTDGGGTVN	
9	(1)	-----MFKFGKKLLTVVLAASMSFGVFAATT--GATDYWQNWTDGGGTVN	
12	(1)	-----MFKFKKKFLVGLTAAFMSSISMFSATASAAGTDYWQNWTDGGGTVN	
20	(1)	-----AGTDYWQNWTDGGGTVN	
5	(1)	-----MFKFKKNFLVGLSAAALMSISLFSATASAASTDYWQNWTDGGGIVN	
		61	120
1	(18)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
10	(44)	ATNGPGGNYSVTWRDTGNFVVGKG-----WEIGSPNRTIHYNAGVWEPSPNGYLTLYG	
18	(16)	ATNGPGGNYSVTWRDTGNFVVGKG-----WEIGSPNRTIHYNAGVWEPSPNGYLTLYG	
11	(55)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
6	(55)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
15	(28)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
19	(28)	MILNHGGTFSAQWNNVNNILFRKGKKFNETQTHQQVGNMSINYGANFQ-PNGNAYLCVYG	
13	(54)	MTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRTHQLGNISINYNASFN-PGGNSYLCVYG	
21	(27)	MTLNNGGAFSAGWNNIGNALFRKGKKFDSTRTHQLGNISINYNASFN-PGGNSYLCVYG	
14	(61)	YTNGDNGEYSVTWVDCGDFTSKGK-----WNP-ANAQTVTYSGEFN-PSGNAYLAVYG	
22	(45)	YTNGDNGEYSVTWVDCGDFTSKGK-----WNP-ANAQTVTYSGEFN-PSGNAYLAVYG	
16	(27)	YTNGPGGQFSVNWSNSGNFVVGKG-----WQPGTKNKVINFSGSYN-PNGNSYLSVYG	
7	(59)	YTNGPGGQFSVNWSNSGNFVVGKG-----WQPGTKNKVINFSGSYN-PNGNSYLSVYG	
2	(27)	YCNGPGGQFSVNWSNSGNFVVGKG-----WQPGTKNRVINFSGSYN-PNGNSYLSVYG	
3	(27)	YTNLEGGTYEISWGDGGNLVGGKG-----WNPGLNARAIHFEGVYQ-PNGNSYLA VYG	
8	(58)	YTNLEGGTYEISWGDGGNLVGGKG-----WNPGLNARAIHFEGVYQ-PNGNSYLA VYG	
4	(10)	MDLGSGGTYSTQWRNTGNFVAGKG-----WSTGG-RKTVNY-SGTENPSPGNAYLTLYG	
17	(16)	AVNGSGGNYSVNWQNTGNFVVGKG-----WTYGTPNRVVNYNAGVFSPSGNGYLTLYG	
9	(44)	AVNGSGGNYSVNWQNTGNFVVGKG-----WTYGTPNRVVNYNAGVFSPSGNGYLTLYG	
12	(46)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
20	(18)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
5	(46)	AVNGSGGNYSVNWSNTGNFVVGKG-----WTTGSPFRTINYNAGVWAPNGNGYLTLYG	
		121	180
1	(71)	WTRSPLEIYYVVDSWGTYRPTG--TYKGTVKSDGGTYDIYTTTRYNAPSIDGDRTTFTQY	
10	(97)	WTRNQLIEYYVVDNWGTYRPTG--THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDG-TQTFQQF	
18	(69)	WTRNQLIEYYVVDNWGTYRPTG--THRGTVVSDGGTYDIYTTMRYNAPSIDG-TQTFQQF	
11	(114)	WTVDP LVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
6	(114)	WTVDP LVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
15	(87)	WTVDP LVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
19	(87)	WTVDP LVEYYIVDSWGNWRPPG-ATPKGTITVDGGTYDIYETLRVNQPSIKG-IATFKQY	
13	(113)	WTQSPLAEYYIVDSWGTYRPTG-AY-KGSFYADGGTYDIYETTRVNQPSIIG-IATFKQY	
21	(86)	WTQSPLAEYYIVDSWGTYRPTG-AY-KGSFYADGGTYDIYETTRVNQPSIIG-IATFKQY	
14	(112)	WTTDPLVEYYIILESYGTYNPSSGLTSLGQVTSDDGGTYDIYSTQVRVNQPSIEG-TSTFNQY	
22	(96)	WTTDPLVEYYIILESYGTYNPSSGLTSLGQVTSDDGGTYDIYSTQVRVNQPSIEG-TSTFNQY	

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

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