

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 704**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C11B 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2015 PCT/US2015/011527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15116395**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2015 E 15703352 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 3099792**

54 Título: **Métodos para mejorar subproductos de procesos de fermentación utilizando xilanas**

30 Prioridad:

31.01.2014 US 201461934612 P

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

12.03.2019

73 Titular/es:

**DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US**

72 Inventor/es:

**TEUNISSEN, PAULA JOHANNA MARIA;
PEPSIN, MICHAEL JAY y
SHARMA, VIVEK**

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 703 704 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

Métodos para mejorar subproductos de procesos de fermentación utilizando xilanasas

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 [0001] La presente solicitud reivindica prioridad y las ventajas de la solicitud de patente provisional estadounidense con n.º de serie 61/934,612, que se presentó el 31 de enero de 2014.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 10 [0002] La presente invención se refiere a métodos para mejorar subproductos (p. ej., aceite) procedentes de procesos de fermentación que incluyen el uso de xilanasas, incluidas xilanasas modificadas, por ejemplo, en el tratamiento de arabinoxilano que contiene materias primas como materiales a base de cereales, p. ej., en la producción de biocombustible u otros productos de fermentación, incluidas sustancias bioquímicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

- 15 [0003] Durante muchos años, se han utilizado endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (denominadas en el presente documento xilanasas) para la modificación de carbohidratos complejos derivados de material de la pared celular vegetal. En la técnica se conoce que la funcionalidad de distintas xilanasas (derivadas de diferentes microorganismos o plantas) difiere considerablemente. Xilanasas es la denominación otorgada a una clase de enzimas que degradan el polisacárido lineal beta-1,4-xilano en xilooligosacáridos o xilosa, descomponiendo así hemicelulosa, uno de los componentes principales de paredes celulares vegetales.
- 20 [0004] En función de la información estructural y genética, se han clasificado xilanasas en distintas familias de glicosil hidrolasas (GH) (Henrissat, (1991) Biochem. J. 280, 309-316).
- [0005] Al principio, todas las xilanasas conocidas y caracterizadas pertenecían a las familias GH10 o GH11. Posteriormente, otros trabajos identificaron numerosos tipos distintos de xilanasas pertenecientes a las familias GH5, GH7, GH8 y GH43 (Collins *et al.* (2005) FEMS Microbiol Rev., 29 (1), 3-23).
- 25 [0006] Hasta ahora, la familia GH11 difiere del resto de GH, siendo la única familia que consiste únicamente en xilanasas específicas de xilano. La estructura de las xilanasas GH11 se puede describir como una estructura β -enrollada o una estructura total de cadena β de pliegue en sándwich (Himmel *et al.*, 1997 Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65, 315-325). Las enzimas GH11 poseen un dominio catalítico de aproximadamente 20 kDa.
- [0007] Las xilanasas GH10 poseen un dominio catalítico con pesos moleculares en el intervalo de 32-39 kDa. La estructura del dominio catalítico de xilanasas GH10 consiste en un barril β/α óctuple (Harris *et al.*, 1996 - Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).
- 30 [0008] Hay disponibles estructuras tridimensionales para un gran número de enzimas de la familia GH10, siendo las primeras determinadas las de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (Derewenda *et al.*, J Biol Chem 19 de agosto de 1994; 269(33) 20811-4), la endoglicanasa Cex de *C. fimi* (White *et al.*, Biochemistry 25 de octubre de 1994; 33(42) 12546-52), y la Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (anteriormente xilanasas A de subespecie de *Pseudomonas fluorescens*) (Harris *et al.*, Structure 15 de noviembre de 1994; 2(11) 1107-16.). Como miembros del clan GHA, presentan un pliegue clásico de barril TIM (α/β)₈ con los dos ácidos glutámicos fundamentales de sitio activo situados en los extremos C-terminales de cadenas beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 18 de julio de 1995; 92(15) 7090-4).
- 35 [0009] Se han llevado a cabo amplios estudios que caracterizan la funcionalidad de xilanasas sobre sustratos bien caracterizados y puros (Kormelink *et al.*, 1992 Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Tesis doctoral, Agricultural University Wageningen, Holanda (175 pp., sumarios inglés y holandés)). Estos estudios muestran que distintas xilanasas presentan requisitos específicos diferentes con respecto a la sustitución del esqueleto de xilosa del arabinoxilano (AX). Algunas xilanasas necesitan tres residuos de xilosa no sustituidos para hidrolizar el esqueleto de xilosa; otros precisan únicamente uno o dos. Se cree que los motivos para estas diferencias de especificidad se deben a la estructura tridimensional en los dominios catalíticos, que, a su vez, depende de la estructura primaria de la xilanasas, esto es, la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la traducción de estas diferencias en las secuencias de aminoácidos en diferencias en la funcionalidad de las xilanasas no ha sido documentada hasta ahora cuando la xilanasas actúa en un entorno complejo, tal como un material vegetal, p. ej., en un alimento para animales.
- 40 [0010] Los sustratos de xilanasas en material vegetal, p. ej., en trigo, se han dividido tradicionalmente en dos fracciones: el AX no extraíble en agua (WU-AX) y el AX extraíble en agua (WE-AX). Se ha explicado en numerosas ocasiones por qué existen dos fracciones distintas de AX. La literatura más antigua (D'Appolonia y MacArthur - (1976, Cereal Chem. 53. 711-718) y Montgomery y Smith (1955, J. Am. Chem. Soc. 77. 3325-332) describe diferencias bastante grandes en el grado de sustitución entre WE-AX y WU-AX. El grado de sustitución más elevado se encontró en WE-AX. Este hecho se empleó para explicar por qué parte del AX se podía extraer.
- 55 El grado de sustitución elevado provocó que el polímero fuera soluble, en comparación con un grado de

sustitución más pequeño, que provocaría la formación de puentes de hidrógeno entre polímeros y, en consecuencia, precipitación.

[0011] Se ha considerado que la diferencia entre la funcionalidad de distintas xilanasas se debe a diferencias en la especificidad de xilanasas y, por ende, en su preferencia por los sustratos WU-AX o WE-AX.

5 **[0012]** El documento WO 03/106654 describe una serie de xilanasas aisladas de una genoteca lambda.

[0013] Se han reportado enzimas xilanasas en cerca de 100 organismos distintos, incluyendo plantas, hongos y bacterias. Las enzimas xilanasas se clasifican en varias de las más de 40 familias de enzimas glicosil hidrolasas. Las enzimas glicosil hidrolasas, que incluyen xilanasas, mananasas, amilasas, β -glucanasas, celulasas, y otras carbohidrasas, se clasifican en función de propiedades tales como la secuencia de aminoácidos, su estructura tridimensional y la geometría de su sitio catalítico (Gilkes, *et al.*, 1991, Microbiol. Reviews 55: 303-315).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0014]

15 La figura 1A muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N.º 26) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). La parte subrayada (en minúsculas) de la secuencia refleja que se puede escindir un péptido señal N-terminal antes de que la enzima sea madura. Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva se pueden escindir también mediante modificación postraducciona antes de que la enzima sea totalmente madura. En algunas formas de realización, esta secuencia puede ser la secuencia esqueleto.

20 La figura 1B muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N.º 27) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva se pueden escindir también mediante modificación postraducciona antes de que la enzima sea totalmente madura. En algunas formas de realización, esta secuencia puede ser la secuencia esqueleto.

25 La figura 1C muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N.º 1) de una xilanasas denominada en el presente documento FveXyn4. Esta es la forma activa de la enzima. En el presente documento, se puede hacer referencia a esta como la forma madura de la enzima (en algunas formas de realización, esta secuencia es una secuencia esqueleto).

La figura 2A muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 24) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Los nucleótidos en minúsculas que están en negrita indican la secuencia intrónica. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (en mayúsculas).

30 La figura 2B muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 25) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (en mayúsculas).

La figura 2C muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 2) que codifica una xilanasas a la que se hace referencia en el presente documento como FveXyn4.

35 La figura 3A muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N.º 28) de una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). La parte subrayada (en minúsculas) de la secuencia puede reflejar un péptido señal N-terminal que se puede escindir antes de que la enzima sea madura. Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva se pueden escindir también mediante modificación postraducciona antes de que la enzima sea completamente madura. En algunas formas de realización, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

40 La figura 3B muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N.º 29) de una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva se pueden escindir también mediante modificación postraducciona antes de que la enzima sea completamente madura. Esta secuencia puede ser cierta forma activa de la proteína y puede ser una forma activa de la proteína. En el presente documento, se puede hacer referencia a esta como la forma madura de la enzima. En algunas formas de realización, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

45 La figura 3C muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N.º 3) de una xilanasas a la que se hace referencia en el presente documento como FoxXyn2. Esta es otra forma activa de la enzima. En algunas formas de realización, se puede hacer referencia a esta como la forma madura de la enzima. En algunas formas de realización, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

50 La figura 4A muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 30) que codifica una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). Los nucleótidos en minúsculas que están en negrita indican la secuencia intrónica. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (en mayúsculas).

La figura 4B muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 31) que codifica una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (en mayúsculas).

La figura 4C muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 4) que codifica una xilanasas a la que se hace referencia en el presente documento como FoxXyn2.

- La figura 5 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N.º 5) de una xilanasa de *Fusarium* (Fusarium Comparative Sequencing Project (Proyecto de secuenciación comparativa de *Fusarium*), Instituto Broad del MIT y Harvard (<http://www.broadinstitute.org/>)). En algunas formas de realización, esta secuencia es una secuencia esqueleto.
- 5 La figura 6A muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 32) que codifica una xilanasa de *Fusarium* para su uso en la presente invención (obtenida a partir del Fusarium Comparative Sequencing Project, Instituto Broad del MIT y Harvard (<http://www.broadinstitute.org/>)). Los nucleótidos en minúsculas que están en negrita indican la secuencia intrónica. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (en mayúsculas). Los cambios en comparación con la SEQ ID N.º 24 aparecen subrayados.
- 10 La figura 6B muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 33) que codifica una xilanasa de *Fusarium* para su uso en la presente invención (obtenida a partir del Fusarium Comparative Sequencing Project, Instituto Broad del MIT y Harvard (<http://www.broadinstitute.org/>)). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (en mayúsculas). Los cambios en comparación con la SEQ ID N.º 25 aparecen subrayados.
- 15 La figura 6C muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N.º 6) que codifica una xilanasa de *Fusarium* para su uso en la presente invención (obtenida a partir del Fusarium Comparative Sequencing Project, Instituto Broad del MIT y Harvard (<http://www.broadinstitute.org/>)), y los cambios en comparación con la SEQ ID N.º 4 aparecen subrayados.
- 20 La figura 7 muestra un alineamiento de las proteínas maduras para FveXyn4 (SEQ ID N.º 1), FoxXyn2 (SEQ ID N.º 3) y la xilanasa que se muestra en el presente documento como SEQ ID N.º 5 (FVEG_13343T0).
- La figura 8 muestra secuencias de nucleótidos (sin intrones) de las secuencias de codificación de variantes de xilanasa GH10 de acuerdo con la presente invención (SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 8, SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10 y SEQ ID N.º 11).
- 25 La figura 9 muestra secuencias de nucleótidos (con intrones subrayados) de las secuencias de codificación de variantes de xilanasas GH10 conforme a la presente invención (SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15 y SEQ ID N.º 16).
- La figura 10 muestra secuencias de aminoácidos de variantes maduras de xilanasas GH10 de acuerdo con la presente invención (SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19, SEQ ID N.º 20 y SEQ ID N.º 21).
- 30 La figura 11 muestra el valor de T_m de las 5 variantes A, B, C, D y E en comparación con FveXyn4. El valor de T_m se mide como la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual tras 10 min de incubación.
- La figura 12 muestra el perfil de pH de las cinco variantes medido con pH 4.0, 5.0 y 6.0, y todos los datos son relativos a FveXyn4 con pH 5.0.
- 35 Las figuras 13a y b muestran la solubilización de pentosano a partir de cDDGS (parte superior de la figura 13a) y salvado de trigo (parte inferior de la figura 13b) en función de la dosis de xilanasa.
- La figura 14 muestra la reducción de viscosidad en el Modelo de ensayo animal *in vitro* de reducción de viscosidad que se enseña en el Ejemplo 1 mediante las variantes de la presente invención y en comparación con FveXyn4 y la Econase XT de referencia. La reducción de viscosidad se mide en trigo con alta viscosidad.
- 40 La figura 15 muestra recuperación de xilanasa tras la granulación en el pienso a 90 y 95 °C. La actividad se representa en relación con la muestra de papilla. Las muestras que contenían FveXyn4 se analizaron utilizando el método de extracción, mientras que las muestras que contenían la variante A-E se analizaron utilizando el método de suspensión, estando descritos ambos métodos en los materiales y métodos del Ejemplo 1.
- La figura 16 muestra un mapa plasmídico de pZZH254.
- 45 La figura 17 muestra el perfil de temperatura de FveXyn4.
- La figura 18 muestra un mapa plasmídico de pZZH135.
- La figura 19 muestra el perfil de temperatura de FoxXyn2.
- La figura 20 muestra el mapa esquemático de pEntry-FveXyn4.
- 50 La figura 21 muestra mapas esquemáticos del vector de destino pTTTpyr2 y los vectores de expresión para las variantes FveXyn4 (pTTTpyr2-FveXyn4) y FveXyn4 (pTTTpyr2-FveXyn4_VAR).
- La figura 22 muestra reducción de viscosidad en material a base de cereales de una enzima estructural (parental) FveXyn4 en comparación con las variantes termoestables A, B, C, D y E conforme a la presente invención. Fve Xyn4 y las variantes actúan de modo similar, mostrando reducción de viscosidad del 55-67 % en comparación con los blancos (únicamente SPEZYME® CL).

La figura 23 muestra el efecto de la variante de xilanasa E en la recuperación de aceite en comparación con FveXyn4 y SFS de DISTILLASE®.

La figura 24 muestra el efecto de xilanasa FveXyn4 en la recuperación de aceite en un ensayo de cuantificación de aceite.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

[0015] En un primer aspecto, la presente invención da a conocer una enzima xilanasa que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21, comprendiendo la enzima xilanasa los aminoácidos 7D, 33V, 79Y, 217Q y 298Y en posiciones correspondientes a la numeración de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21, y donde la enzima xilanasa posee actividad xilanasa y es capaz de incrementar la recuperación de aceite a partir de material a base de cereales en comparación con la enzima xilanasa de la SEQ ID N.º 1.

[0016] Un descubrimiento adicional de la presente invención es la modificación de una xilanasa GH10 para producir una mejora en la xilanasa GH10 con respecto a la xilanasa GH10 parental, en el sentido de que la enzima xilanasa modificada contempla un incremento de la recuperación de aceite a partir de material a base de cereales.

[0017] En otro aspecto, la presente invención ofrece procesos para recuperar aceite utilizando las xilanasas de la presente invención conforme a lo expuesto en las reivindicaciones adjuntas.

[0018] Las otras propiedades de las xilanasas de la presente invención son su capacidad para descomponer (solubilizar) arabinoxilanos insolubles (AXinsol).

[0019] En particular, las variantes de xilanasa de la presente invención descomponen (solubilizan) eficientemente AXinsol de una amplia variedad de sustratos, incluyendo maíz, trigo, DDGS, etc., en concreto, maíz y sustratos a base de maíz, especialmente tanto productos de trigo (incluyendo a base de trigo) como de maíz (incluyendo productos a base de maíz). Esto contrasta con enzimas anteriormente conocidas, que a menudo resultan peores para solubilizar AXinsol en sustratos de maíz o a base de maíz o que no resultan eficientes ni en sustratos a base de trigo ni en sustratos a base de maíz.

[0020] Además, las variantes de xilanasa de la presente invención son especialmente buenas no solo para descomponer (solubilizar) AXinsol, sino también para descomponer (o degradar) de manera eficaz los polímeros solubilizados. Al ser capaz de descomponer (degradar) de manera eficaz (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos tras disolver AXinsol), se obtiene una reducción (rápida) de viscosidad o los polímeros solubilizados (obtenidos al disolver AXinsol) no pueden contribuir a incrementar la viscosidad. Este último efecto resulta fundamental en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

[0021] Sin querer limitarse a la teoría, la variante de enzima de la presente invención libera principalmente polímeros, que no contribuyen a la viscosidad, debido a que los polímeros liberados son cortos.

[0022] Normalmente, las xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, pero a menudo conducirá a un incremento de la viscosidad de la mezcla. Este incremento de viscosidad resulta inconveniente en muchas aplicaciones.

[0023] Sin querer limitarse a la teoría, a pesar de que algunas xilanasas convencionales descomponen AXinsol, estas conducen a un incremento de los productos de degradación solubles con peso molecular elevado, lo cual conduce a un incremento de viscosidad en la mezcla.

[0024] Además, o de manera alternativa, y de nuevo sin querer limitarse a la teoría, enzimas xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, aunque, puesto que no degradan los productos solubilizados de peso molecular elevado lo suficientemente rápido, la viscosidad en la mezcla no es ideal. En cambio, con los métodos y usos de la presente invención, las variantes de xilanasa descomponen AXinsol sin incrementar la viscosidad y/o al mismo tiempo que reduce rápidamente la viscosidad en comparación con enzimas convencionales. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que los productos con peso molecular elevado no están formados por las enzimas de la presente invención.

[0025] Se ha descubierto que las enzimas de la presente invención y conforme se han descrito en el presente documento, no solo descomponen (solubilizan) arabinoxilanos insolubles (AXinsol) de una amplia variedad de sustratos, incluidos maíz, trigo, DDGS, etc., especialmente sustratos de maíz y a base de maíz, en concreto tanto productos de trigo (incluyendo a base de trigo) como de maíz (incluyendo a base de maíz), sino que también aseguran eficientemente que la viscosidad no aumenta ni disminuye. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que los productos con peso molecular elevado no están formados por las enzimas de la presente invención.

[0026] Así, la presente invención se refiere a enzimas capaces de solubilizar pentosanos, en concreto materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, especialmente arabinoxilanos insolubles. En concreto, la enzima resulta especialmente buena para solubilizar pentosanos, en concreto materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, en concreto arabinoxilanos insolubles, en un amplio espectro de sustratos, incluidos sustratos a base de maíz.

[0027] La presente invención se refiere además a enzimas capaces de degradar AXsol o los productos de degradación de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incrementa ni se reduce en la mezcla de reacción.

[0028] Muchas de las xilanasas comercializadas para su uso en alimentos para animales para solubilizar pentosanos son enzimas GH11. Los expertos en la materia habían considerado que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes a la hora de solubilizar pentosanos, especialmente AXinsol, en comparación con xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha descubierto que la xilanasa novedosa dada a conocer en el presente documento, que es una xilanasa GH10, resulta especialmente buena para degradar AXinsol en un amplio espectro de sustratos, incluidos sustratos a base de maíz. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que las variantes de xilanasa GH10 de la presente invención superan a las xilanasas comerciales GH11 en su capacidad para solubilizar pentosanos. Además, las variantes de xilanasa GH10 son termoestables.

[0029] El hecho de que las presentes enzimas degraden de manera eficiente AXinsol a partir de sustratos de maíz y a base de maíz resulta significativamente ventajoso, ya que el maíz contiene mucho más AX en la forma insoluble en comparación con otros cereales, como, por ejemplo, el trigo y el centeno. Por lo tanto, únicamente las xilanasas que pueden descomponer AXinsol pueden mostrar ventajas significativas en animales alimentados con una dieta a base de maíz, como, por ejemplo, una dieta de maíz y soja.

[0030] No se esperaba en absoluto que una xilanasa GH10 resultara tan buena para degradar AXinsol en cereales, especialmente en sustratos de maíz o a base de maíz.

[0031] Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar de manera eficaz (y rápidamente) los polímeros y oligómeros que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes en material a base de cereales. Esto deriva en una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 expuestas en el presente documento en el sentido de que resultan especialmente buenas en una serie de aplicaciones para mantener la viscosidad baja o para reducir la viscosidad, p. ej., en alimentos para animales; en la producción de cerveza y/o malteado; en la producción de glucosa a base de cereales, p. ej., para su procesamiento posterior a biocombustibles y/o sustancias bioquímicas (p. ej., isopreno biológico); o en el sector de la separación de gluten de trigo y almidón para la producción de almidón, por ejemplo.

[0032] Particularmente, se ha descubierto que, como promedio, el producto de degradación es más corto para las enzimas GH10 analizadas en el presente documento en comparación con enzimas GH11. Esto implica que los productos de degradación no provocan ni contribuyen a un incremento de la viscosidad.

[0033] En función de estos hallazgos, las variantes de xilanasa de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para degradar un material que contiene xilano, sobre todo arabinoxilanos, especialmente AXinsol. Además, o de manera alternativa, las xilanasas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para degradar polímeros solubles (p. ej., oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes (de forma natural) en materiales a base de cereales. Sorprendentemente, se ha descubierto que las variantes de xilanasa de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar tanto para degradar un material que contiene xilano, sobre todo arabinoxilanos, especialmente AXinsol, como para degradar polímeros solubles (p. ej., oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol.

[0034] Dichas enzimas pueden presentar una aplicación útil en muchos sectores, incluyendo el de alimentos para animales, malteado y elaboración de cerveza, en el tratamiento de arabinoxilano que contiene materias primas como materiales a base de cereales (en el presente documento, los materiales a base de cereales incluyen granos y cereales), en el sector de separación de gluten de trigo y almidón, en la producción de jarabes derivados de almidón, en la producción de biocombustible, y similares.

[0035] Según se utiliza en el presente documento, el término «variante(s) de xilanasa» se puede utilizar indistintamente con «xilanasa(s) modificada(s)».

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS DE LA INVENCION

[0036] A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnico-científicos utilizados en el presente documento poseen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente exposición. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20ª ED., John Wiley e Hijos, Nueva York (1994), y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991), brindan a un experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente descripción.

[0037] La presente descripción no está limitada por los ejemplos de materiales y métodos expuestos en el presente documento, y cualquier material y método similar o equivalente a los descritos en el presente documento se puede utilizar en la práctica o en el análisis de formas de realización de la presente descripción. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Salvo que se indique de otro modo, cualquier secuencia de ácido nucleico está escrita de izquierda a derecha en orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos están escritas de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi, respectivamente.

[0038] Los encabezamientos ofrecidos en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o formas de realización de esta exposición que se pueden tomar como referencia para la memoria en general. Por

consiguiente, los términos que se definen inmediatamente a continuación se definen de forma más completa con referencia a la memoria en su conjunto.

[0039] En el presente documento, se hace referencia a aminoácidos empleando el nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una única letra.

5 **[0040]** El término «proteína», según se utiliza en el presente documento, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

10 **[0041]** Según se utiliza en el presente documento, el término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo del término «polipéptido» y/o del término «proteína». En algunos casos, el término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo del término «péptido». En algunos casos, el término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo del término «péptido».

15 **[0042]** Los términos «proteína» y «polipéptido» se utilizan indistintamente en el presente documento. En la presente descripción y reivindicaciones, se pueden utilizar los códigos convencionales de una letra y de tres letras para residuos de aminoácidos. El código de 3 letras para aminoácidos se define de conformidad con la Comisión Conjunta de Nomenclatura Bioquímica IUPACIUB (JCBN). Se comprenderá también que se puede codificar un polipéptido mediante más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

20 **[0043]** Según se utiliza en el presente documento, el término «almidón» se refiere a cualquier material comprendido por los carbohidratos complejos polisacáridos de plantas, comprendido por amilosa y amilopectina con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, donde «X» puede ser cualquier número. En concreto, el término se refiere a cualquier material vegetal, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, granos, hierbas, tubérculos y raíces y, más en concreto, trigo, cebada, maíz, centeno, arroz, sorgo, salvados, mandioca, mijo, patata, boniato y tapioca. «Almidón granular» se refiere a almidón sin cocinar (crudo), que no ha sido sometido a gelatinización, donde «gelatinización de almidón» significa solubilización de una molécula de almidón para formar una suspensión viscosa.

25 **[0044]** Según se utiliza en el presente documento, la «hidrólisis de almidón» y términos similares hace referencia a la escisión de enlaces glucosídicos con la adición de moléculas de agua. Así, las enzimas que presentan «actividad de hidrólisis de almidón» catalizan la escisión de enlaces glucosídicos con la adición de moléculas de agua.

30 Según se utiliza en el presente documento, «azúcares fermentables» se refiere a sacáridos que son capaces de ser metabolizados en condiciones de fermentación. Normalmente, estos azúcares se refieren a glucosa, maltosa y maltotriosa (DP1, DP2 y DP3).

35 **[0045]** Pueden aparecer otras definiciones de términos a lo largo de la memoria. Antes de describir los ejemplos de formas de realización con mayor detalle, ha de entenderse que la presente descripción no se limita a formas de realización concretas descritas, ya que, naturalmente, estas pueden variar. Ha de entenderse además que la terminología empleada en el presente documento tiene por objeto describir únicamente formas de realización concretas, y que no se pretende que posea carácter limitativo, puesto que el alcance de la presente descripción únicamente estará limitado por las reivindicaciones anexas.

40 **[0046]** Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que se describe también de manera específica cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. La presente descripción abarca cada intervalo menor entre cualquier valor indicado o valor intermedio en un intervalo establecido y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo establecido. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden estar incluidos o excluidos de manera independiente en el intervalo, y cada intervalo en el que cualquiera, ninguno o ambos límites estén incluidos en los intervalos menores también está abarcado en la presente descripción, sujeto a cualquier límite excluido específicamente en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluya uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la presente descripción.

50 **[0047]** Se debe apreciar que, según se emplean en el presente documento y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. En consecuencia, por ejemplo, la referencia a «una enzima» incluye una pluralidad de dichos agentes candidatos, y la referencia a «el pienso» incluye la referencia a uno o más piensos y a equivalentes de los mismos que conozcan los expertos en la materia, etc.

55 **[0048]** El aumento de los precios de materias primas usadas tradicionalmente como fuente de energía en alimentos para animales, como materia prima en la producción de biocombustible, y como ingrediente para la producción de cerveza o el malteado, o como materia prima en procesos de separación de gluten de trigo y almidón, por ejemplo, ha dado como resultado la inclusión de materiales fibrosos de bajo coste en los sustratos de partida para estos sectores, especialmente el uso de subproductos fibrosos de bajo coste en alimentos para animales.

[0049] La adición de fibra puede provocar varios efectos desventajosos. Por ejemplo, en alimentos para animales, la adición de fibra puede provocar efectos antinutricionales. Como resultado, la presencia de polímeros no degradados presentes en el intestino del animal forma un contenido altamente viscoso y una distribución obstaculizada con una reducción de la absorción de nutrientes. Además, los polímeros poseen una elevada capacidad de retención de agua que impide una reabsorción efectiva de agua, y la retención de agua incrementa el volumen del contenido intestinal, lo cual deriva en una disminución del período de tiempo del tránsito intestinal (Englyst y Kingman (1993) en *Human Nutrition and Dietetics*, 9.^a edición (Garrow J. S., James W. P. T., eds.) p. 53).

[0050] En materiales a base de cereales y alimentos para animales, la hemicelulosa y celulosa (incluyendo arabinoxilano insoluble) pueden formar barreras físicas que encapsulan (o atrapan) nutrientes como almidón, aceite y proteína, y limitan el acceso de este modo a estos componentes.

[0051] La hemicelulosa y celulosa (incluyendo arabinoxilanos insolubles (AXinsol)) por sí mismas suponen también potenciales fuentes de energía, ya que consisten en sacáridos C5 y C6. El animal puede utilizar monosacáridos C6 como fuente de energía, mientras que los oligosacáridos C5 se pueden transformar en ácidos grasos de cadena corta por acción de la microflora presente en el intestino del animal (van den Broek *et al.*, 2008 *Molecular Nutrition & Food Research*, 52, 146-63), y dichos ácidos grasos de cadena corta pueden ser absorbidos y digeridos por el intestino del animal.

[0052] La liberación de nutrientes y agua procedentes de alimentos para animales como consecuencia de la degradación de la barrera física depende de la capacidad de la xilanasa para degradar componentes fibrosos insolubles (p. ej., arabinoxilanos insolubles (AXinsol)).

[0053] La presente invención expone una enzima xilanasa que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21, comprendiendo la enzima xilanasa los aminoácidos 7D, 33V, 79Y, 217Q y 298Y en posiciones correspondientes a la numeración de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21, y donde la enzima xilanasa posee actividad xilanasa y es capaz de incrementar la recuperación de aceite a partir de material a base de cereales en comparación con la enzima xilanasa de la SEQ ID N.º 1.

[0054] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta, de acuerdo con la presente invención, comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

30 7D;
 33V;
 79Y;
 217Q; y
 298Y.

[0055] El término «parental» se refiere a una xilanasa, preferiblemente una xilanasa GH10, en la que se realiza una alteración para producir una enzima modificada de la presente invención. En una forma de realización, la enzima parental es una xilanasa GH10. Convenientemente, la enzima parental puede ser un polipéptido de origen natural (tipo natural) o una variante o fragmento de este. En una forma de realización preferida, la enzima parental es de origen natural (polipéptido de tipo natural).

[0056] La xilanasa GH10 modificada o xilanasa GH10 de acuerdo con la presente invención (y reivindicada en el presente documento) presenta de forma adecuada aproximadamente al menos un 90 % de identidad de secuencia (preferiblemente al menos un 93 %, convenientemente al menos un 97 %, de forma adecuada al menos un 99 % de identidad de secuencia con la enzima parental).

[0057] El término «esqueleto» o «estructural», según se utiliza en el presente documento, implica una secuencia polipeptídica que es un polipéptido de xilanasa GH10, que se modifica para comprender los siguientes aminoácidos en al menos una o más de las posiciones indicadas: 7D; 25P; 33V; 64T; 79Y; 89G; 217Q; y 298Y, donde la numeración se basa en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID N.º 1).

[0058] La enzima que presenta actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10, de la presente invención (p. ej., la enzima xilanasa GH10 modificada) comprende preferiblemente un polipéptido que presenta al menos un 70 % (de manera adecuada al menos un 80 %, de manera adecuada al menos un 90 %, de manera adecuada al menos un 95 %, de manera adecuada al menos un 98 %, de manera adecuada al menos un 99 %) de identidad con respecto a una xilanasa GH10 (p. ej., una xilanasa GH10 parental o estructural); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más posiciones (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente en todas) indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente 79Y, F o V, más preferiblemente Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente 217Q, E o P, más preferiblemente Q); y 298Y, F o W (preferiblemente Y o F, más preferiblemente Y) donde la numeración se basa en la numeración de aminoácido de FveXyn4 (SEQ ID N.º 1).

[0059] La enzima que presenta actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10, de la presente invención (p. ej., la enzima xilanasa GH10 modificada) comprende preferiblemente un polipéptido que presenta al menos un 95% (de manera adecuada al menos un 98 %, de manera adecuada al menos un 99 %) de identidad con respecto a una xilanasa GH10 (p. ej., una xilanasa GH10 parental o estructural); y comprende los siguientes aminoácidos en al menos una o más de las posiciones indicadas: 7D; 25P; 33V; 64T; 79Y; 89G; 217Q; y 298Y, donde la numeración se basa en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID N.º 1).

[0060] De manera adecuada, la xilanasa GH10 parental o estructural se puede obtener (obtener de modo adecuado) a través de un organismo de *Fusarium*.

[0061] Convenientemente, la xilanasa parental o estructural es una endo-1,4-β-d-xilanasa.

[0062] La xilanasa modificada o xilanasa GH10 de acuerdo con la presente invención es preferiblemente una endo-1,4-β-d-xilanasa.

En una forma de realización preferida, la enzima que presenta actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención presenta un valor de T_m de más de 70 °C (preferiblemente más de 75 °C), donde el valor de T_m se mide como la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual tras 10 min de incubación.

[0063] Se puede determinar la termoestabilidad de una xilanasa (p. ej., una xilanasa modificada) de acuerdo con la presente invención empleando el «Ensayo para la medición de termoestabilidad» (ver abajo).

Ensayo para la medición de termoestabilidad

[0064] Los perfiles de desnaturalización térmica de las variantes de FveXyn4 se midieron diluyendo y preincubando las muestras enzimáticas en 25 mM de tampón MES, pH 6.0 durante 10 min a diversas temperaturas (63, 65,5, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76, 76,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6, y 85 °C, respectivamente) y midiendo posteriormente la actividad residual por medio del método de actividad xilanasa descrito en el Ejemplo 1. La actividad medida sin preincubación se configuró al 100 % y la actividad residual de cada variante a cada temperatura se calculó en relación con esta. El valor de T_m se calcula a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual.

[0065] En una forma de realización, una enzima se considera termoestable conforme a la presente invención si presenta un valor de T_m de más de 70 °C, donde el valor de T_m es la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual tras 10 min de incubación. Este valor de T_m se puede medir de acuerdo con el ensayo para la medición de termoestabilidad según se da a conocer en el presente documento.

[0066] En una forma de realización, una enzima se considera termoestable conforme a la presente invención si presenta un valor de T_m de más de 76 °C, donde el valor de T_m es la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual tras 10 min de incubación. Este valor de T_m se puede medir de acuerdo con el ensayo para la medición de termoestabilidad como se explica en el presente documento.

[0067] En una forma de realización, una enzima se considera termoestable conforme a la presente invención si presenta un valor de T_m de más de 85 °C, donde el valor de T_m es la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual tras 10 min de incubación. Este valor de T_m se puede medir de acuerdo con el ensayo para la medición de termoestabilidad según se da a conocer en el presente documento.

[0068] Preferiblemente, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención (o composición que comprenda la misma) puede soportar un tratamiento térmico (por ejemplo, durante el proceso de granulación) de hasta aproximadamente 70 °C; p. ej., de hasta 75 °C, p. ej., de hasta 76 °C, p. ej., de hasta aproximadamente 85 °C; p. ej., de hasta aproximadamente 95 °C. El tratamiento térmico se puede llevar a cabo durante hasta aproximadamente 1 minuto; hasta aproximadamente 5 minutos; hasta aproximadamente 10 minutos; hasta aproximadamente 30 minutos; hasta aproximadamente 60 minutos. El hecho de soportar dicho tratamiento térmico implica que al menos aproximadamente un 50 % de la enzima que estaba presente/activa en el aditivo antes de calentarse a la temperatura especificada todavía está presente/activa tras enfriarse a la temperatura ambiente. Preferiblemente, al menos aproximadamente un 80 % de la enzima que está presente y activa en el aditivo antes de calentarse a la temperatura especificada todavía está presente y activa tras enfriarse a la temperatura ambiente.

[0069] El término «termoestabilidad» es la capacidad de una enzima para resistir inactivación irreversible (generalmente mediante desnaturalización) a una temperatura relativamente alta.

[0070] Existen diversos modos para medir la termoestabilidad. A título de ejemplo, las muestras enzimáticas se pueden incubar sin sustrato durante un período de tiempo definido (p. ej., 10 min o de 1 a 30 min) a una temperatura elevada en comparación con la temperatura a la que la enzima es estable durante un tiempo más largo (días). Tras la incubación a temperatura elevada, se analizó la actividad residual de la muestra enzimática a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30 °C (de manera alternativa, 25-50 °C o incluso hasta 70 °C). Se

calcula la actividad residual en relación con una muestra de la enzima que no ha sido incubada a la temperatura elevada.

[0071] Se puede medir también la termoestabilidad como inactivación enzimática en función de la temperatura. En este caso, se incuban muestras enzimáticas sin sustrato durante un período de tiempo determinado (p. ej., 10 min o de 1 a 30 min) a diversas temperaturas y tras la incubación que se analiza para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30 °C (de manera alternativa, 25-70 °C o incluso más elevada). Se calcula la actividad residual a cada temperatura en relación con una muestra de la enzima que no ha sido incubada a la temperatura elevada. El perfil de desnaturalización térmica resultante (temperatura frente a actividad residual) se puede utilizar para calcular la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual. Este valor se define como el valor de T_m.

[0072] Es más, se puede medir la termoestabilidad como inactivación enzimática en función del tiempo. En este caso, se incuban muestras enzimáticas sin sustrato a una temperatura elevada definida (p. ej., 76 °C) durante diversos períodos de tiempo (p. ej., entre 10 s y 30 min) y tras la incubación que se analiza para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30 °C (de manera alternativa, 25-70 °C o incluso más elevada). Se calcula la actividad residual a cada temperatura en relación con una muestra enzimática que no ha sido incubada a la temperatura elevada. El perfil de inactivación resultante (tiempo frente a actividad residual) se puede utilizar para calcular el tiempo en el cual se obtiene el 50 % de actividad residual. Este se determina normalmente como T_{1/2}.

[0073] Estos son ejemplos de cómo medir la termoestabilidad. La termoestabilidad se puede medir también por medio de otros métodos. Preferiblemente, se analiza la termoestabilidad mediante el empleo del «Ensayo para la medición de termoestabilidad» según se da a conocer en el presente documento.

[0074] En contraposición a la termoestabilidad, la termoactividad es la actividad enzimática en función de la temperatura. Para determinar la termoactividad, las muestras enzimáticas se pueden incubar (analizar) durante el período de tiempo definido por el ensayo a diversas temperaturas en presencia de sustrato. La actividad enzimática se obtiene durante la incubación o inmediatamente después de esta según lo definido por el ensayo (p. ej., leyendo un valor de DO que refleja la cantidad de producto de reacción formado). La temperatura a la que se obtiene la actividad más elevada es la temperatura óptima de la enzima en las condiciones de ensayo dadas. Se puede calcular la actividad obtenida a cada temperatura en relación con la actividad obtenida a la temperatura óptima. Esto proporcionará un perfil de temperatura para la enzima en las condiciones de ensayo dadas.

[0075] En la presente solicitud, la termoestabilidad no es equivalente a la termoactividad.

[0076] De forma adecuada, la xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención posee un pH óptimo en el intervalo de 4.6 a 7, preferiblemente de aproximadamente 5 a 6.

[0077] En una forma de realización preferida, la xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas en el presente documento como SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19, SEQ ID N.º 20, o SEQ ID N.º 21, o un fragmento de estas que presenta actividad xilanasa.

[0078] En una forma de realización, las modificaciones en la secuencia esqueleto de polinucleótidos son tales para dejar las modificaciones detalladas anteriormente en la secuencia de aminoácidos codificada:

Los métodos de la presente invención resultan adecuados para dejar las modificaciones conforme se ha dado a conocer anteriormente en la secuencia de polinucleótidos o de aminoácidos.

[0079] La célula hospedadora de la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en una célula bacteriana, célula fúngica, una célula de levadura, una célula de hongo filamentoso y una célula vegetal. Preferiblemente, la célula hospedadora es una célula bacteriana o fúngica.

[0080] En algunas formas de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se puede utilizar directamente como un fermentado sin aislamiento ni purificación de la enzima.

[0081] En algunas formas de realización, la composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención o la premezcla de acuerdo con la presente invención comprende además una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x) o una proteasa estable en ácido y/o una amilasa (incluyendo α -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas de formación de G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y γ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)).

[0082] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en un método para degradar material que contiene arabinoxilano en un material que contiene xilano.

[0083] De manera adecuada, el arabinoxilano puede ser arabinoxilano insoluble (AXinsol).

[0084] En una forma de realización, el material que contiene xilano se selecciona de entre uno o más del grupo que consiste en: un pienso o alimento para animales; un componente alimentario; un material a base de cereales; una papilla; un mosto; una malta; cebada malteada; un adjunto, una papilla de cebada; y una harina de cereales.

5 **[0085]** En una forma de realización preferida, los arabinoxilanos se solubilizan sin incrementar la viscosidad en el medio de reacción.

[0086] En una forma de realización de la presente invención, el pienso o alimento para animales o componente alimentario comprende o consiste en maíz, DDGS (por ejemplo, cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de los mismos.

10 **[0087]** En una forma de realización preferida, el pienso o alimento para animales es un alimento para animales a base de maíz.

[0088] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en combinación con una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x) o una proteasa estable en ácido) y/o una amilasa (incluyendo α -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas de formación de G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y γ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)).

[0089] En una forma de realización, el método o uso de acuerdo con la presente invención comprende administrar a un sujeto una enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención, o un fermentado que comprende dicha enzima de acuerdo con la presente invención, o una composición enzimática que comprende dicha enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención, o una composición de aditivo para pienso que comprende dicha enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención, o una premezcla que comprende dicha enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención o un alimento para animales que comprende dicha enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención.

[0090] En una forma de realización, el método o uso de la presente invención es (o forma parte de) un proceso de separación de gluten de trigo y almidón.

[0091] En otra forma de realización, el método o uso de la presente invención es (o forma parte de) un proceso de producción de un biocombustible (p. ej., bioetanol) o sustancia bioquímica (p. ej., isopreno biológico).

30 **[0092]** En otra forma de realización, el método o uso de la presente invención es (o forma parte de) un proceso de malteado o producción de cerveza.

[0093] De manera adecuada, la presente invención contempla una bebida fermentada, p. ej., cerveza, producida mediante un método de acuerdo con la presente invención.

[0094] En el presente documento, se puede hacer referencia a la enzima xilanasa parental de la presente invención en una forma de realización como FveXyn4.

[0095] Tanto las secuencias polipeptídicas como las secuencias de ácidos nucleicos que se dan a conocer en el presente documento están, preferiblemente, aisladas.

[0096] La xilanasa de la presente invención es preferiblemente una xilanasa GH10. Dicho de otro modo, la xilanasa puede presentar un peso molecular en el intervalo de 32-39 kDa y/o el dominio catalítico de la xilanasa consiste en una estructura de barril β/α óctuple (según se da a conocer en Harris *et al.*, 1996 - Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

[0097] En un aspecto de la invención, la xilanasa de la invención es una xilanasa de la familia de glicosil hidrolasas (GH) 10. El término «de la familia de glicosil hidrolasas (GH) 10» implica que la xilanasa en cuestión pertenece o se puede clasificar en la familia GH 10.

45 **[0098]** Las búsquedas de similitud proteica (p. ej., *blast* de proteínas en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) pueden determinar si una secuencia desconocida entra dentro del concepto de un miembro de la familia de xilanasa GH10, en concreto las familias GH se pueden categorizar en función de la homología de secuencias en regiones clave. Además, o de forma alternativa, para determinar si una secuencia proteica desconocida es una proteína xilanasa encuadrada en la familia GH10, la evaluación se puede llevar a cabo no solo en lo que respecta a la similitud/homología/identidad, sino también en lo que respecta a la estructura 3D. La clasificación de familias GH se basa a menudo en el pliegue 3D. El *software* que predecirá el pliegue 3D de una secuencia proteica desconocida es HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). El poder de este *software* para la predicción de la estructura proteica se basa en la identificación de secuencias homólogas con estructura conocida para ser utilizadas como patrón. Esto funciona tan bien debido a que las estructuras divergen mucho más lentamente que las secuencias primarias. Las proteínas de la misma familia pueden presentar estructuras muy similares incluso cuando sus secuencias han divergido más allá del reconocimiento.

[0099] En la práctica, se puede pegar una secuencia desconocida en el *software* (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) en formato FASTA. Tras hacer esto, se puede remitir la búsqueda. Los resultados de la búsqueda mostrarán una lista de secuencias con estructuras 3D conocidas. De hecho, para confirmar que la secuencia desconocida es una xilanasa GH10, las xilanasas GH10 se pueden encontrar dentro de la lista de homólogos que presentan una probabilidad de >90. No todas las proteínas identificadas como homólogas se caracterizarán como xilanasas GH10, pero sí algunas. Las últimas proteínas son proteínas con una estructura conocida y caracterización bioquímica que las identifica como xilanasas. Las primeras no se han caracterizado bioquímicamente como xilanasas GH10. Varias referencias describen este protocolo, tales como Söding J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison - *Bioinformatics* 21, 951-960 (doi:10.1093/bioinformatics/bti125) y Söding J, Biegert A, y Lupas AN. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction - *Nucleic Acids Research* 33, W244-W248 (problema del servidor web) (doi:10.1093/nar/gki40).

[0100] De acuerdo con el sitio Cazy (<http://www.cazy.org/>), las glicosil hidrolasas de la familia 10 se pueden caracterizar de la siguiente forma:

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

Mecanismo: Conservación

Clan: GH-A

Nucleófilo catalítico/Base: Glu (experimental)

Donador de protones catalítico: Glu (experimental)

Estado de estructura 3D: (β/α)₈

[0101] La xilanasa GH10 de la presente invención puede poseer un dominio catalítico con pesos moleculares en el intervalo de 32-39 kDa. La estructura del dominio catalítico de la xilanasa GH10 de la presente invención consiste en un barril β/α óctuple (Harris *et al.*, 1996 - *Acta. Crystallog. Sec. D* 52, 393-401).

[0102] Hay disponibles estructuras tridimensionales para un gran número de enzimas de la familia GH10, siendo las primeras determinadas las de la xilanasa A de *Streptomyces lividans* (Derewenda *et al.*, *J Biol Chem* 19 de agosto de 1994; 269(33) 20811-4), la endoglicanasa Cex de *C. fimi* (White *et al.*, *Biochemistry* 25 de octubre de 1994; 33(42) 12546-52), y la Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (anteriormente xilanasa A de subespecie de *Pseudomonas fluorescens*) (Harris *et al.*, *Structure* 15 de noviembre de 1994; 2(11) 1107-16.). Como miembros del clan GHA, estas presentan un pliegue clásico de barril TIM (α/β)₈ con los dos ácidos glutámicos fundamentales de sitio activo situados en los extremos C-terminales de cadenas beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 18 de julio de 1995; 92(15) 7090-4).

[0103] El término «xilanasa GH10», según se utiliza en el presente documento, implica un polipéptido que posee actividad xilanasa y que presenta un pliegue de barril TIM (α/β)₈ con los dos ácidos glutámicos de sitio activo fundamentales situados en los extremos C-terminales de cadenas beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo).

[0104] Se puede hacer referencia a la enzima xilanasa estructural (o parental) utilizada en el presente documento como FveXyn4 o FoxXyn 2 (estos términos se refieren a las proteínas activas, p. ej., las proteínas maduras).

[0105] En una forma de realización, la xilanasa es preferiblemente una xilanasa fúngica.

[0106] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención y/o una enzima parental es una xilanasa GH10.

[0107] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención (y/o xilanasa parental) es preferiblemente una xilanasa GH10 fúngica.

[0108] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención (y/o xilanasa parental) es preferiblemente una endoxilanasa, p. ej., una endo-1,4-β-d-xilanasa. La clasificación para una endo-1,4-β-d-xilanasa es E.C. 3.2.1.8.

[0109] En algunas formas de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención, presenta un pH óptimo en aproximadamente 6.

[0110] Preferiblemente, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención conserva más del 70 % de actividad máxima entre pH 4 y 8, convenientemente entre pH 4.6 y 7.

[0111] En algunas formas de realización, p. ej., en aplicaciones para piensos, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta, de acuerdo con la presente invención conserva preferiblemente más del 70 % de actividad máxima entre 5.1 y 7.

5 **[0112]** Sin querer limitarse a la teoría, el pH puede presentar también un efecto importante en la eficacia y eficiencia enzimáticas. En concreto, para aplicaciones para piensos, el perfil de pH de las xilanasas de la presente invención favorece la actividad en el intestino delgado, con condiciones neutras.

[0113] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención es capaz de degradar (o degrada) un material que contiene xilano, sobre todo arabinoxilanos, especialmente arabinoxilanos insolubles (AXinsol).

10 **[0114]** En otra forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención es capaz de degradar (o degrada) polímeros solubles (p. ej., oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes (de forma natural) en material a base de cereales.

15 **[0115]** En otra forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención es capaz de degradar (o degrada) tanto un material que contiene xilano, sobre todo arabinoxilanos, especialmente AXinsol, y polímeros solubles (p. ej., oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol.

20 **[0116]** En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta de acuerdo con la presente invención no se ve afectada por los inhibidores de xilanasas de trigo, p. ej., inhibidores proteicos, p. ej., inhibidores proteicos de tipo TAXI en trigo. Las xilanasas fúngicas del estado de la técnica pueden estar inhibidas un máximo de 70-95 % mediante inhibidores proteicos de trigo. Preferiblemente, las xilanasas de la presente invención están inhibidas únicamente en un 20-30 % como máximo en aplicaciones de trigo.

[0117] Las siglas TAXI se refieren a inhibidores de xilanasas de *Triticum aestivum*, presentes en cereales.

25 **[0118]** El término «consiste fundamentalmente en», según se utiliza en el presente documento, implica que puede haber componentes no especificados presentes si las características de la composición reivindicada no se ven afectadas materialmente de ese modo.

[0119] El término «consiste en» implica que las proporciones de los ingredientes específicos deben dar un total de 100 %.

30 **[0120]** El término «comprender» utilizado en el presente documento se puede modificar en algunas formas de realización para referirse a consistir fundamentalmente en o consistir en (presentando ambos un significado más limitado que «comprender»).

[0121] En una forma de realización, el material que contiene arabinoxilano insoluble no es paja de trigo.

35 **[0122]** El término «fragmento del mismo/de la misma», según se utiliza en el presente documento, implica un fragmento activo. Dicho de otro modo, el fragmento es uno que posee actividad xilanasa. De manera adecuada, el fragmento puede presentar la misma actividad xilanasa que la enzima xilanasa GH10 modificada de longitud completa de la cual deriva el fragmento. De forma alternativa, el fragmento puede poseer una actividad modificada (p. ej., especificidad mejorada, actividad específica, pH o perfil de temperatura) en comparación con la enzima xilanasa GH10 modificada de longitud completa de la que deriva el fragmento. Además, el fragmento debe conservar las propiedades termoestables de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual es un fragmento.

40 **[0123]** Se describe también una enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta que

a) comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas en el presente documento como SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19, SEQ ID N.º 20, o SEQ ID N.º 21, o bien b) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 96 %, preferiblemente al menos un 98,5 %, idéntica con las secuencias de aminoácidos mostradas en el presente documento como SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19, SEQ ID N.º 20, o SEQ ID N.º 21 siempre que los aminoácidos en las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 sean idénticas a las que se muestran en SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19, SEQ ID N.º 20, o SEQ ID N.º 21.

45 **[0124]** Se describe también una molécula de ácido nucleico o un vector o constructo que comprende la misma, donde la secuencia de nucleótidos se selecciona de entre el grupo que consiste en: SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 8, SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15 y SEQ ID N.º 16; o una secuencia de nucleótidos que es al menos un 96 %, preferiblemente un 98,5 %, idéntica con respecto a las secuencias de nucleótidos que se muestran en el presente documento como SEQ ID N.º 7,

SEQ ID N.º 8, SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15 o SEQ ID N.º 16 siempre que los codones que codifican las posiciones de aminoácido 7, 33, 79, 217 y 298 en la proteína madura sean iguales a los de las SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 8, SEQ ID N.º 9, SEQ ID N.º 10, SEQ ID N.º 11, SEQ ID N.º 12, SEQ ID N.º 13, SEQ ID N.º 14, SEQ ID N.º 15 o SEQ ID N.º 16.

5 **[0125]** El término «modificar» según se utiliza en el presente documento significa cambiar o alterar. En concreto, el término «modificar», según se utiliza en el presente documento, significa alterar con respecto a lo que sucede de forma natural. Dicho de otro modo, al modificar la enzima, se cambia la enzima de tal manera que la enzima queda alterada con respecto a la enzima estructural parental. Preferiblemente, la enzima modificada no existe por sí misma en la naturaleza. Así, la enzima modificada es una enzima que no es de origen natural.

10 **[0126]** El término «modificado/a», según se utiliza en el presente documento, significa alterado/a, por ejemplo, respecto a su forma presente de manera natural. Las enzimas modificadas de acuerdo con la presente invención son preferiblemente enzimas que no están presentes de forma natural o variantes que no ocurren de manera natural. Dicho de otro modo, las enzimas modificadas de acuerdo con la presente invención son preferiblemente enzimas modificadas que no se han encontrado en la naturaleza. Preferiblemente, las enzimas modificadas de la
15 presente invención no se han originado de manera espontánea.

[0127] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo una enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención se puede utilizar de manera adecuada en cualquiera de las siguientes aplicaciones:

- a) Un aditivo en alimentos para animales; y/o
- 20 b) Un suplemento de pienso para un animal; y/o
- c) Descomposición de material a base de cereales (p. ej., puede ser grano entero o parte de grano). Los productos de descomposición (p. ej., glucosa) se pueden utilizar como materia prima para cualquier proceso de fermentación, como en la producción de biocombustible (p. ej., bioetanol), o en la producción de otros productos, tales como sustancias bioquímicas (p. ej., isopreno biológico). En tales procesos, la xilanasa
25 modificada puede mejorar la recuperación de subproductos, p. ej., la recuperación de aceite. Por consiguiente, en una forma de realización, la presente invención se refiere a la producción de biocombustible (p. ej., bioetanol), por ejemplo, mediante la mejor recuperación de aceite, y a la mejor utilización de material a base de cereales en la industria de los biocombustibles; y/o
- d) Industria de la separación de gluten de cereal (p. ej., trigo) y almidón. El/los producto(s) resultante(s)
30 puede(n) ser almidón (p. ej., almidón purificado) y/o gluten y/o fibras y/o sustancias hidrosolubles (tales como pentosanos solubles). La recuperación mejorada de subproductos, p. ej., la recuperación de aceite, se contempla también junto con dicho proceso. En una forma de realización, la presente invención se refiere a la producción de almidón y/o gluten; y/o
- e) Mejorar el malteado y la producción de cerveza, p. ej., descomponiendo material a base de cereales (p. ej., cebada malteada). La recuperación mejorada de subproductos, p. ej., la recuperación de aceite, se contempla
35 también junto con dicho proceso; y/o
- f) Degradar AXsol o los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incrementa ni se reduce en la mezcla de reacción;
- g) Reducir la viscosidad al degradar materiales a base de cereales, p. ej., en procesos de producción de
40 biocombustible (p. ej., bioetanol).

[0128] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención, se utiliza en un alimento para animales. Preferiblemente, un alimento para animales que comprende maíz o que es un alimento para animales a base de maíz.

45 **[0129]** En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada), o un fragmento de esta de la presente invención se utiliza en el malteado o en la elaboración de cerveza.

[0130] En otra forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención se utiliza
50 en la separación de gluten de trigo y almidón.

[0131] En todavía otra forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención se utiliza para descomponer material a base de cereales y puede formar parte del proceso de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol).

55

VENTAJAS

[0132] La enzima novedosa que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma que se da a conocer en el presente documento presenta muchas ventajas en comparación con xilanasas conocidas.

- 5 **[0133]** La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención es termoestable. Por ejemplo, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención es significativamente más estable que la xilanasa parental (estructural) antes de la modificación. Convenientemente, la xilanasa modificada presenta un valor de T_m de más de 70 °C (preferiblemente más de 75 °C), donde el valor de T_m se mide como la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual tras 10 min de incubación.

[0134] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención resulta también inesperadamente buena para la recuperación mejorada de aceite.

- 15 **[0135]** La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención resulta también inesperadamente buena para solubilizar pentosanós.

- 20 **[0136]** La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención resulta inesperadamente buena para solubilizar AXinsol.

- 25 **[0137]** Sorprendentemente, se ha descubierto que la enzima que presenta actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención resulta especialmente buena para degradar materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, p. ej., AXinsol, en un amplio espectro de sustratos, maíz, trigo, DDGS, etc., en concreto sustratos de maíz y a base de maíz, en particular tanto productos de trigo (incluyendo a base de trigo) como de maíz (incluyendo productos a base de maíz). En comparación con las xilanasas de referencia, que son todas xilanasas producidas comercialmente y comercializadas, la xilanasa novedosa que se expone en el presente documento fue capaz de llevar a cabo una degradación y liberación de pentosanós mucho más eficiente a partir de más materiales vegetales (en concreto sustratos a base de maíz) en comparación con las xilanasas comercializadas.
- 30 Este hecho ocurrió de modo completamente inesperado. Esto contrasta con enzimas anteriormente conocidas, que a menudo resultan peores para solubilizar AXinsol en sustratos de maíz o a base de maíz o que no resultan tan eficientes en sustratos a base de trigo ni en sustratos a base de maíz.

- 35 **[0138]** Además, la enzima que presenta actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, resulta especialmente buena no solo para descomponer (solubilizar) AXinsol, sino también para descomponer (o degradar) los polímeros solubilizados de manera eficiente. Al ser capaces de descomponer (degradar) de manera eficiente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos a partir de la disolución de AXinsol), se obtiene una reducción de la viscosidad. Este último efecto resulta fundamental en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

- 40 **[0139]** Normalmente, las xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, pero a menudo conducirán a un incremento de la viscosidad de la mezcla. Este incremento de viscosidad resulta inconveniente en muchas aplicaciones.

- 45 **[0140]** Se ha descubierto que la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de la misma, de la presente invención y según se ha descrito en el presente documento, no solo descompone (solubiliza) arabinoxilanos insolubles (AXinsol) de una amplia variedad de sustratos, incluidos maíz, trigo, DDGS, etc., especialmente sustratos de maíz y a base de maíz, en concreto tanto productos de trigo (incluyendo a base de trigo) como de maíz (incluyendo productos a base de maíz), sino que también descompone de manera eficiente los polímeros solubilizados de este modo para asegurar que la viscosidad no se incrementa ni se reduce.

- 50 **[0141]** La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y según se ha descrito en el presente documento, es capaz de degradar AXsol o los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incrementa ni se reduce en la mezcla de reacción.

- 55 **[0142]** Muchas de las xilanasas comercializadas para su uso en alimentos para animales para solubilizar pentosanós son enzimas GH11. Los expertos en la materia habían considerado que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes a la hora de solubilizar pentosanós, especialmente AXinsol, en comparación con xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha descubierto que la(s) xilanasa(s) modificada(s) novedosa(s) dada(s) a conocer en el presente documento, que es/son una(s) xilanasa(s) GH10, resulta(n) especialmente buena(s) para solubilizar

AXinsol en un amplio espectro de sustratos, incluidos sustratos a base de maíz. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que las xilanasas GH10 modificadas de la presente invención (y expuestas en el presente documento) superan a las xilanasas GH11 comerciales en cuanto a capacidad para solubilizar pentosanos.

- 5 **[0143]** El hecho de que las presentes enzimas solubilizan de manera eficiente AXinsol a partir de sustratos de maíz y a base de maíz resulta significativamente ventajoso, puesto que el maíz contiene mucho más AX en forma insoluble en comparación con otros cereales, como, por ejemplo, el trigo y el centeno. Por lo tanto, únicamente las xilanasas que pueden descomponer AXinsol pueden mostrar ventajas significativas para animales alimentados, por ejemplo, con una dieta a base de maíz y soja.
- 10 **[0144]** No se esperaba en absoluto que una xilanasa GH10 resultara tan buena para solubilizar AXinsol en cereales, especialmente en sustratos de maíz o a base de maíz.
[0145] Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar de manera eficaz (y rápidamente) los polímeros y/u oligómeros que se producen a partir de la solubilización de AXinsol o que están presentes en material a base de cereales. Esto deriva en una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 modificadas
15 expuestas en el presente documento en cuanto a que resultan especialmente buenas en una serie de aplicaciones para mantener la viscosidad baja o para reducir la viscosidad, p. ej., en alimentos para animales; en la producción de cerveza y/o malteado; en la producción de glucosa a base de cereales, p. ej., para su procesamiento posterior a biocombustibles y/o sustancias bioquímicas (p. ej., isopreno biológico); o en el sector de la separación de gluten de trigo y almidón para la producción de almidón, por ejemplo.
- 20 **[0146]** Además, la xilanasa GH10 modificada de la presente invención es especialmente termoestable. Este hecho ofrece ventajas significativas en algunas aplicaciones. En concreto, en aplicaciones para piensos, las enzimas se pueden someter a tratamiento térmico, p. ej., durante los procesos de granulación. Por consiguiente, las enzimas necesitan ser capaces de mantener su actividad después de dicho procesamiento. Las xilanasas modificadas de la presente invención son especial e inesperadamente termoestables.
- 25 **[0147]** Asimismo, una mejor termoestabilidad resulta también muy beneficiosa durante la degradación de almidón, que tiene lugar a temperaturas elevadas durante la licuefacción (en torno a 85-95 °C). El hecho de que sea termoestable permite la adición de la enzima durante esta etapa.
[0148] En particular, se ha descubierto que, como promedio, el producto de degradación procedente del uso de la xilanasa modificada es más corto para las enzimas GH10 analizadas en el presente documento en
30 comparación con enzimas GH11. Esto potencia la disminución del efecto de la viscosidad.
[0149] Además, otra ventaja de la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (incluyendo la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (al contrario que muchas xilanasas GH11) no se ven afectadas por inhibidores de xilanasa en el trigo, p. ej., inhibidores proteicos de tipo TAXI, que actúan en el trigo.
- 35 **[0150]** Una ventaja de la presente invención es que mejora la separación de gluten de trigo y almidón.
[0151] La enzima de la presente invención resulta especialmente efectiva para potenciar el rendimiento de un sujeto o para mejorar la digestibilidad de una materia prima en un pienso y/o para mejorar la eficiencia alimenticia en un sujeto.

MATERIAL QUE CONTIENE XILANO

- 40 **[0152]** La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención (o composición que comprende la xilanasa modificada de la presente invención) se puede utilizar para degradar cualquier material que contenga xilano.
[0153] En una forma de realización, el material que contiene xilano es cualquier material vegetal que comprende
45 arabinoxilano.
[0154] En una forma de realización, el material que contiene xilano es cualquier material vegetal que comprende arabinoxilano insoluble (AXinsol).
[0155] En una forma de realización, el material que contiene xilano es un alimento para animales o componente de pienso.
- 50 **[0156]** En una forma de realización, el material que contiene xilano es un material a base de cereales (incluyendo granos enteros o granos parciales o granos malteados, p. ej., cebada malteada). Cuando el método se refiere a la producción de biocombustibles (p. ej., producción de bioetanol), el material que contiene xilano es entonces, preferiblemente, un material a base de cereales.
- 55 **[0157]** En otra forma de realización, el material que contiene xilano puede ser una malta o papilla de cebada, o cebada malteada o combinaciones de las mismas.

[0158] En todavía otra forma de realización, el material que contiene xilano puede ser una harina de cereales (p. ej., harina de trigo, de avena, de centeno o de cebada). Cuando el método se refiere a un proceso de separación de gluten y almidón, el material que contiene xilano es, preferiblemente, una harina de cereales (p. ej., harina de trigo, de avena, de centeno o de cebada).

5 DESCOMPOSICIÓN O DEGRADACIÓN

[0159] La enzima que presenta actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención (o composición que comprende la enzima) se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol o AXsol o productos de degradación de AXinsol.

10 **[0160]** El término "descomponer" o "degradar" es sinónimo de "hidrolizar".

SOLUBILIZACIÓN / DEGRADACIÓN

15 **[0161]** La presente invención se refiere a un método para degradar un material que contiene xilano (preferiblemente, un material que contiene arabinoxilano, preferiblemente un material que contiene arabinoxilano insoluble (AXinsol)) para producir pentosanos solubles (que pueden ser poliméricos, oligoméricos o monoméricos).

[0162] Este método se puede describir en el presente documento como solubilización de pentosanos o solubilización de arabinoxilano o solubilización de AXinsol o degradación de AXinsol.

20 **[0163]** En una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para degradar (o descomponer) arabinoxilano insoluble (AXinsol). Se puede hacer también referencia al mismo como solubilización de arabinoxilano insoluble y/o solubilización de pentosanos.

[0164] En otra forma de realización de la presente invención, el método se refiere a degradar (p. ej., descomponer) polímeros derivados de la degradación de arabinoxilanos insolubles.

ARABINOXILANO (AX)

25 **[0165]** El término «arabinoxilanos» (AX), según se utiliza en el presente documento, implica un polisacárido que consiste en un esqueleto de xilano (unidades de xilosa enlazadas 1,4) con L-arabinofuranosa (L-arabinosa en su forma de anillo con 5 átomos) acoplado de forma aleatoria mediante enlaces $1\alpha \rightarrow 2$ y/o $1\alpha \rightarrow 3$ a las unidades de xilosa a lo largo de la cadena. El arabinoxilano es una hemicelulosa hallada tanto en la pared celular vegetal primaria como en la secundaria. El arabinoxilano se puede encontrar en el salvado de granos tales como el trigo, el maíz, el centeno y la cebada.

30 **[0166]** El arabinoxilano (AX) se encuentra en estrecha relación con la pared celular vegetal, donde actúa como pegamento uniendo diversos elementos básicos de la pared celular y del tejido vegetal, aportando tanto resistencia estructural como rigidez.

[0167] El término «pentosano», según se utiliza en el presente documento, es cualquiera de entre un grupo de carbohidratos que producen pentosas en hidrólisis completa.

35 **[0168]** Puesto que tanto la xilosa como la arabinosa (los componentes de los arabinoxilanos) son pentosas, los arabinoxilanos se clasifican normalmente como pentosanos.

[0169] El AX es la principal porción de polisacárido no amiláceo (PNA) en varias de las materias primas para piensos más importantes, incluyendo el trigo y el maíz.

40 **[0170]** Su abundancia, ubicación en el material vegetal y estructura molecular provocan que los AX afecten de manera grave y negativa a la digestibilidad alimentaria, reduciendo en la práctica el valor nutricional de las materias primas en las que están presentes. Esto hace que los AX sean un importante factor antinutricional, reduciendo la eficiencia productiva animal.

45 **[0171]** Asimismo, los AX puede poseer un grave impacto negativo al tratar de descomponer material vegetal, por ejemplo, en procesos tales como la elaboración de cerveza, el malteado, la producción de biocombustibles, reduciendo de manera efectiva la cantidad de sustrato accesible en la materia prima vegetal.

[0172] Los AX pueden contener también cantidades considerables de agua (a lo que se puede hacer referencia como su capacidad de retención de agua), que puede provocar que los arabinoxilanos solubles deriven en una (elevada) viscosidad, lo cual supone un inconveniente en muchas aplicaciones.

50 **[0173]** El término «hemicelulosa», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a los componentes polisacáridos de las paredes celulares vegetales que no son celulosa. El término «hemicelulosa», según se utiliza en el presente documento, puede referirse a los polisacáridos en las paredes celulares vegetales que son extraíbles mediante soluciones alcalinas diluidas. Las hemicelulosas comprenden casi un tercio de los carbohidratos en el tejido vegetal leñoso. La estructura química de las hemicelulosas consiste en cadenas largas de varias pentosas, hexosas, y sus correspondientes ácidos urónicos. Las hemicelulosas se pueden hallar en

frutas, tallos y cáscaras de granos. El xilano es un ejemplo de un pentosano que consta de unidades de D-xilosa con enlaces $1\beta \rightarrow 4$.

ARABINOXILANO INSOLUBLE EN AGUA (AXinsol)

5 [0174] El arabinoxilano insoluble en agua (AXinsol), también conocido como arabinoxilano no extraíble en agua (WU-AX), constituye una proporción significativa de la materia seca del material vegetal.

[0175] En el trigo, el AXinsol puede suponer un 6,3 % de la materia seca. En el salvado de trigo y DDGS de trigo, el AXinsol puede suponer aproximadamente un 20,8 % o un 13,4 % de la materia seca (peso/peso).

[0176] En el centeno, el AXinsol puede suponer un 5,5 % de la materia seca.

10 [0177] En el maíz, el AXinsol puede suponer un 3,5-6 % (p. ej., 5,1 %) de la materia seca. En los DDGS de maíz, el AXinsol puede suponer un 10-20 % (p. ej., 12,6 %) de la materia seca.

[0178] El AXinsol provoca atrapamiento de nutrientes en piensos. Existen grandes cantidades de nutrientes digeribles, tales como almidón y proteínas, que permanecen incluidos en agrupaciones de material de la pared celular, o bien unidos a cadenas laterales del AX. Estos nutrientes atrapados no estarán disponibles para la digestión y la posterior absorción en el intestino delgado.

15 ARABINOXILANO HIDROSOLUBLE (AXsol)

[0179] El arabinoxilano hidrosoluble (AXsol), también conocido como arabinoxilano extraíble en agua (WE-AX), puede causar problemas en la producción de biocombustibles, producción de sustancias bioquímicas, procesamiento de carbohidratos y/o malteado y/o elaboración de cerveza y/o en piensos, ya que pueden provocar un incremento de la viscosidad debido a la capacidad higroscópica del AXsol.

20 [0180] En los piensos, el AXsol puede tener un efecto antinutricional, especialmente en monogástricos, ya que provocan un incremento considerable de la viscosidad del contenido intestinal, a causa de la extraordinaria capacidad higroscópica del AXsol. El aumento de la viscosidad puede afectar a la digestión de pienso y al uso de nutrientes, ya que puede impedir una mezcla adecuada de pienso con enzimas digestivas y sales biliares, y/o ralentiza la disponibilidad y absorción de nutrientes y/o estimula la fermentación en el tubo digestivo posterior.

25 [0181] En el trigo, el AXsol puede suponer un 1,8 % de la materia seca. En el salvado de trigo y DDGS de trigo, el AXsol puede suponer aproximadamente un 1,1 % o un 4,9 % de la materia seca (peso/peso).

[0182] En el centeno, el AXsol puede suponer un 3,4 % de la materia seca.

[0183] En la cebada, el AXsol puede suponer un 0,4 - 0,8 % de la materia seca.

30 [0184] En el maíz, el AXsol puede suponer un 0,1 - 0,4 % (p. ej., un 0,1 %) de la materia seca. En los DDGS de maíz, el AXsol puede suponer un 0,3-2,5 % (p. ej., 0,4 %) de la materia seca.

[0185] No obstante, además de la cantidad de AXsol presente en el material vegetal, cuando una xilanasas solubiliza AXinsol en el material vegetal, se pueden liberar pentosanos y/u oligómeros que contribuyen al contenido de AXsol del material vegetal.

35 [0186] Una ventaja significativa de las xilanasas modificadas dadas a conocer en el presente documento es que estas poseen la capacidad para solubilizar AXinsol sin incrementar la viscosidad. Actualmente, se cree que no se forman productos con alto peso molecular. Una descomposición de AXsol puede reducir la viscosidad.

[0187] Una descomposición de AXsol puede liberar nutrientes.

VISCOSIDAD

40 [0188] La presente invención se puede utilizar para asegurar que la viscosidad no se incrementa y/o para reducir la viscosidad en cualquier proceso en el que la capacidad higroscópica de AXsol provoque un incremento no deseable en la viscosidad.

[0189] La presente invención se refiere a asegurar que la viscosidad no se incrementa y/o para reducir la viscosidad descomponiendo (degradando) AXsol o descomponiendo (degradando) los polímeros y/u oligómeros producidos mediante la solubilización de AXinsol.

45 [0190] Sin querer limitarse a la teoría, al ser capaz de descomponer (degradar) de manera eficaz (rápidamente) los polímeros solubilizados (p. ej., oligómeros) obtenidos a partir de la disolución de AXinsol, se puede evitar un incremento no deseable de la viscosidad y/o se puede obtener una reducción de la viscosidad. El término «de manera eficaz», según se utiliza en el presente documento, implica que la enzima es capaz de degradar los polímeros (p. ej., oligómeros) que se forman mediante solubilización del AXinsol más rápido que la velocidad con la que se degrada (o se solubiliza) el AXinsol.

50 [0191] El hecho de reducir la viscosidad presenta ventajas en muchas aplicaciones, tal y como se da a conocer en el presente documento.

[0192] Un ensayo *in vitro* que trata de imitar el entorno del intestino delgado de un pollo se describió originalmente en Bedford y Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). El ensayo consta de una incubación del pienso en dos etapas, primero con un pH bajo con pepsina y posteriormente una incubación con pancreatina con un pH neutro. Por lo general, se acepta que la viscosidad del sobrenadante tras la incubación final se correlaciona con la viscosidad generada *in vivo* en pollos de engorde.

[0193] Sin incrementar la viscosidad y/o una reducción de la viscosidad, según se expone en el presente documento para aplicaciones para piensos, significa que la adición de la xilanasa dará como resultado una viscosidad sin cambios o menor, medida según el método descrito en el Ejemplo 1. Se entiende por «sin cambios» que el valor medido, siendo la media de tres repeticiones, se encuentra dentro de dos desviaciones estándar del valor medido para una muestra de trigo sin adición de xilanasa.

[0194] La viscosidad se puede medir empleando los siguientes dispositivos: analizador rápido de viscosidad (RVA) (p. ej., para el procesamiento de bioetanol) y viscosímetro Haake VT550 (Thermofisher) (p. ej., para el procesamiento de gluten de trigo y almidón). Ambos dispositivos pueden monitorizar los perfiles de viscosidad de procesos de etanol combustible y de procesos de separación de almidón de trigo, de los cuales se dan a conocer las condiciones experimentales en el Ejemplo 6 y 7, respectivamente.

[0195] En la presente invención, se puede calcular una reducción de la viscosidad comparando una muestra que comprende la xilanasa de la presente invención (o dada a conocer en el presente documento) con otra muestra comparable sin la xilanasa de la presente invención (o dada a conocer en el presente documento).

[0196] Al comparar los perfiles de reducción de viscosidad de la xilanasa de la presente invención con los de la(s) xilanasa(s) comercializada(s) de referencia, se muestra el rendimiento enzimático. El objetivo es mejorar el rendimiento enzimático en comparación con la referencia del mercado. La(s) enzima(s) de referencia para las aplicaciones individuales se expone(n) en los ejemplos descritos a continuación.

[0197] La enzima de referencia para comparar la reducción de viscosidad en aplicaciones para piensos puede ser Econase®XT.

[0198] Un ejemplo de una xilanasa utilizada en la industria del bioetanol es Xylathin™.

[0199] Un ejemplo de una xilanasa utilizada en la industria de separación de gluten de trigo y almidón es Shearzyme™.

[0200] La enzima de referencia para la revisión de la termoestabilidad puede ser la xilanasa parental (estructural) (p. ej., antes de la modificación).

[0201] En una forma de realización de la presente invención, las xilanasas dadas a conocer en el presente documento son reductoras de la viscosidad.

[0202] Por lo general, en primer lugar, el trigo (u otro cereal) se muele en seco para separar el salvado y el germen del endospermo, que se muele para transformarse en harina. Esta harina de endospermo se fracciona a continuación a través de un proceso de separación de almidón de trigo en varios flujos de producto con diversos valores comerciales. El objetivo principal es producir un grado refinado de almidón A, que consiste en gránulos grandes y lenticulares de 15-40 µm. El almidón B de segundo flujo consiste en gránulos de almidón menos purificados, que son esféricos y pequeños (1-10 µm). (C.C. Maningat, P.A. Seib, S.D. Bassi, K.S. Woo, G.D. Lasater, Capítulo 10 del libro «Starch» (2009) 441-451, Wheat starch: production, properties, modification and uses). El almidón de trigo aislado forma el material de partida para la producción de almidón modificado con aplicaciones tanto en aplicaciones alimentarias como no alimentarias. El gluten vital es el tercer producto de valor añadido en los procesos de separación del trigo. La vitalidad del gluten de trigo aislado se determina mediante la capacidad para formar redes viscoelásticas, necesarias para la elaboración de pan. El gluten vital encapsula el dióxido de carbono formado en la preparación de la masa durante la cocción y, por lo tanto, aumenta el volumen del pan. (Anne van der Borgh, Hans Goesaert, Wim S. Veraverbeke, Jan A. Delcour, Journal of Cereal Science 41 (2005) 221-237, Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved). Por consiguiente, se utiliza a menudo para enriquecer harinas para la elaboración de pan, con el fin de lograr productos de pan mejorados. Otros mercados para el gluten lo incluyen como un aditivo en productos vegetarianos, de carne, de pescado o avícolas, incluyendo los de la industria de los alimentos para mascotas; los cereales para el desayuno; o la salsa de soja. Debido a su termoplaticidad y sus buenas propiedades para formar películas, el gluten se utiliza también en mercados no alimentarios como adhesivos. (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey, C.W. Wrigley, Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 82-90, Wheat-gluten uses and industry needs.).

[0203] Las xilanasas modificadas dadas a conocer en el presente documento se pueden utilizar para reducir la viscosidad (o para no incrementar la viscosidad) en procesos destinados a separar harina de cereales (p. ej., harina de trigo, de avena, de centeno o de cebada) en fracciones de almidón y gluten y para mejorar la separación degradando oligosacáridos que dificultan la aglomeración de gluten.

[0204] La viscosidad del mosto, y la viscosidad de la papilla de cebada y de la malta de cebada en la elaboración de cerveza y en el malteado pueden provocar inconvenientes significativos durante la elaboración de cerveza y/o

el malteado. La presente invención se refiere a reducir la viscosidad (o no incrementar la viscosidad) del mosto, papilla de cebada, malta de cebada o una combinación de los mismos.

PIENSO O ALIMENTO PARA ANIMALES

5 **[0205]** La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición de aditivo para pienso de la presente invención se puede utilizar como un pienso, o en la preparación de un pienso.

[0206] El término «pienso» se utiliza en el presente documento como sinónimo de «alimento para animales».

[0207] Preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano de la presente invención es un alimento para animales, o un componente de un alimento para animales, o un componente de piensos.

10 **[0208]** El pienso puede encontrarse en forma de solución o como un sólido o un semisólido, en función del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

[0209] Cuando se utiliza como un pienso (o en la preparación de un pienso), tal como un pienso funcional, se puede utilizar la enzima o composición de la presente invención junto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, 15 un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente aceptable.

[0210] En una forma de realización preferida, la composición enzimática o de aditivo para pienso de la presente invención se mezcla con un componente de pienso para formar un alimento para animales.

20 **[0211]** El término «componente de pienso», según se utiliza en el presente documento, se refiere a la totalidad o a parte del alimento para animales. Parte del alimento para animales puede implicar un componente del alimento para animales o más de un componente del alimento para animales, p. ej., 2 o 3 o 4. En una forma de realización, el término «componente de pienso» abarca una premezcla o componentes de la premezcla.

[0212] Preferiblemente, el pienso puede ser un forraje, o una premezcla de este, un pienso compuesto, o una premezcla de este. En una forma de realización, la composición de aditivo para piensos de acuerdo con la presente invención se puede mezclar con un pienso compuesto, un componente de pienso compuesto o con una 25 premezcla de un pienso compuesto o con un forraje, un componente de forraje, o una premezcla de un forraje.

[0213] Según se utiliza en el presente documento, el término «forraje» se refiere a cualquier alimento que se proporciona a un animal (en lugar de ser el propio animal quien lo busca por sí mismo). El forraje abarca plantas que han sido cortadas.

30 **[0214]** El término «forraje» incluye piensos ensilados, comprimidos y granulados, aceites y raciones mezcladas, así como granos y legumbres germinados.

[0215] El forraje se puede obtener a partir de una o más de las plantas seleccionadas de entre: maíz, alfalfa, <http://en.wikipedia.org/wiki/Barley> cebada, loto corniculado, coles, col de meollo, col rizada, colza (canola), colinabo (nabo sueco), nabo, trébol, trébol híbrido, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco, Festuca, bromo, mijo, avena, sorgo, soja, árboles (brotes de árboles con copa podada para heno de árboles), trigo, y legumbres.

35 **[0216]** El término «pienso compuesto» se refiere a un pienso comercial en forma de harina, gránulos, bolitas, pasta o grumos. Los piensos compuestos se pueden mezclar a base de diversas materias primas y aditivos. Estas mezclas se formulan de acuerdo con los requisitos específicos del animal de destino.

40 **[0217]** Los piensos compuestos pueden ser piensos completos que aporten la totalidad de los nutrientes diarios necesarios, concentrados que aporten una parte de la ración (proteína, energía) o suplementos que aporten únicamente micronutrientes adicionales, tales como minerales y vitaminas.

[0218] Los ingredientes principales utilizados en piensos compuestos son cereales para piensos, entre los que se incluye el maíz, trigo, harina de canola, harina de colza, altramuza, soja, sorgo, avena y cebada.

45 **[0219]** Convenientemente, según se señala en el presente documento, una premezcla puede ser una composición compuesta por microingredientes tales como vitaminas, minerales, conservantes químicos, antibióticos, productos de fermentación y otros ingredientes esenciales. Las premezclas son habitualmente composiciones adecuadas para mezclarse en raciones comerciales.

[0220] Cualquier alimento para animales de la presente invención puede comprender uno o más material(es) para piensos seleccionado(s) del grupo que comprende a) cereales, tales como granos pequeños (p. ej., trigo, cebada, centeno, avena, triticale y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes, tales como maíz o sorgo; 50 b) subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, pasta húmeda (especialmente pasta húmeda a base de maíz), granos secos de destilería (DDG) (especialmente granos secos de destilería a base de maíz (cDDG)), granos secos de destilería con solubles (DDGS) (especialmente granos secos de destilería con solubles a base de maíz (cDDGS)), salvado de trigo, harinillas de trigo, moyuelos de trigo, salvado de arroz, cascarillas de arroz, cascarillas de avena, palmiste y pulpa de cítrico; c) proteína obtenida a partir de fuentes 55 como soja, girasol, cacahuete, altramuza, guisantes, habas, algodón, canola, harina de pescado, proteína

plasmática seca, harina de huesos y carne, proteína de patata, suero de leche, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidos a partir de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.

[0221] En una forma de realización, el alimento para animales comprende o consiste en maíz, DDGS (por ejemplo, cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de los mismos.

5 **[0222]** En una forma de realización, el componente de piensos puede ser maíz, DDGS (p. ej., cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de los mismos.

[0223] En una forma de realización, el alimento para animales comprende o consiste en maíz, DDGS (tal como cDDGS) o una combinación de los mismos.

10 **[0224]** En una forma de realización, un componente de piensos puede ser maíz, DDGS (tal como cDDGS) o una combinación de los mismos.

[0225] Un alimento para animales de la presente invención puede contener al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, o al menos un 60 % en peso de harina de maíz y soja o maíz y soja con grasa, o harina de trigo o harina de girasol.

15 **[0226]** Un alimento para animales de la presente invención puede contener entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 40 % de DDGS de maíz. En el caso de las aves, el alimento para animales puede contener, de media, entre aproximadamente un 7 y un 15 % de DDGS de maíz. En el caso de ganado porcino (cerdos), el alimento para animales puede contener, de promedio, de un 5 a un 40 % de DDGS de maíz.

20 **[0227]** Un alimento para animales de la presente invención puede contener maíz como único cereal, en cuyo caso el alimento para animales puede comprender entre aproximadamente un 35 % y aproximadamente un 80 % de maíz.

[0228] En los alimentos para animales que comprenden mezclas de cereales, por ejemplo, que comprenden maíz y trigo, el alimento para animales puede comprender al menos un 10 % de maíz.

25 **[0229]** Además, o como alternativa, un alimento para animales de la presente invención puede comprender al menos un material para pienso con un elevado contenido de fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material para pienso con un elevado contenido de fibra para proporcionar un alimento para animales con un alto contenido de fibra. Entre los ejemplos de materiales para piensos con alto contenido de fibra se incluyen: trigo, cebada, centeno, avena, subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, pienso de gluten de maíz, pasta húmeda, granos secos de destilería (DDG), granos secos de destilería con solubles (DDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, moyuelos de trigo, salvado de arroz, cascarillas de arroz, cascarillas de avena, 30 palmiste y pulpa de cítrico. Se puede considerar también que algunas fuentes de proteínas presentan un alto contenido de fibra: proteína obtenida a partir de fuentes tales como girasol, altramuz, habas y algodón.

35 **[0230]** En una forma de realización, el alimento para animales de la presente invención comprende al menos un material con un elevado contenido de fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material para pienso con alto contenido de fibra seleccionado del grupo que consiste en granos secos de destilería con solubles (DDGS) (especialmente, cDDGS, pasta húmeda, granos secos de destilería (DDG)), sobre todo cDDG, salvado de trigo y trigo, por ejemplo.

40 **[0231]** En una forma de realización, el alimento para animales de la presente invención comprende al menos un material con un elevado contenido de fibra y/o al menos un subproducto del al menos un material para piensos con alto contenido de fibra seleccionado del grupo que consiste en granos secos de destilería con solubles (DDGS), especialmente, cDDGS, salvado de trigo y trigo, por ejemplo.

45 **[0232]** En la presente invención, el pienso puede ser uno o más de los siguientes: un pienso compuesto y premezcla, incluyendo gránulos, bolitas o pasta (para ganado); un cultivo o residuo de cultivo: maíz, soja, sorgo, avena, cebada, copra, paja, cascarillas, residuos de remolacha azucarera; harina de pescado; harina de huesos y carne; melaza; torta de oleaginosas y torta de prensado; oligosacáridos; plantas forrajeras conservadas; ensilado; algas; semillas y granos, ya sean enteros o preparados mediante trituración, molienda, etc.; granos y legumbres germinados; extracto de levadura.

50 **[0233]** En la presente invención, el término «pienso» abarca, en algunas formas de realización, alimento para mascotas. Un alimento para mascotas es un material vegetal o animal destinado al consumo por parte de mascotas, tal como alimento para perros o alimento para gatos. El alimento para mascotas, tal como alimento para perros y para gatos, puede estar en formato seco, como el pienso para perros, o en formato húmedo y enlatado. El alimento para gatos puede contener el aminoácido taurina.

55 **[0234]** En la presente invención, el término «pienso» abarca, en algunas formas de realización, alimento para peces. Un alimento para peces contiene normalmente macronutrientes, oligoelementos y vitaminas necesarios para mantener a los peces cautivos en buen estado de salud. El alimento para peces puede estar en forma de copos, gránulos o pastillas. Las formas granuladas, algunas de las cuales se hunden rápidamente, se suelen utilizar para peces más grandes o para especies que se alimentan en el fondo. Algunos alimentos para peces

contienen además aditivos, como betacaroteno u hormonas sexuales, para potenciar de manera artificial el color de los peces ornamentales.

- 5 **[0235]** En la presente invención, el término «pienso» abarca, en algunas formas de realización, alimento para aves. El alimento para aves incluye alimento que se utiliza tanto en comederos para pájaros como para alimentar pájaros de compañía. Normalmente, el alimento para aves comprende varias semillas, aunque puede comprender también sebo (grasa de vaca o de cordero).

- 10 **[0236]** Según se utiliza en el presente documento, el término «contactado/a(s)» se refiere a la aplicación indirecta o directa de la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención en el producto (p. ej., el pienso). Entre los ejemplos de los métodos de aplicación que se pueden utilizar se incluye, aunque sin carácter limitativo, tratar el producto en un material que comprende la composición de aditivo para pienso, la aplicación directa mezclando la composición de aditivo para pienso con el producto, rociar la composición de aditivo para pienso sobre la superficie del producto o bañar el producto en una preparación de la composición de aditivo para pienso.

- 15 **[0237]** En una forma de realización, la composición de aditivo para pienso de la presente invención se mezcla preferiblemente con el producto (p. ej., alimento para animales). Como alternativa, la composición de aditivo para pienso se puede incluir en la emulsión o en los ingredientes crudos de un alimento para animales.

[0238] Para algunas aplicaciones, es importante que la composición se ponga a disposición en la superficie, o sobre esta, de un producto que se vaya a tratar o que vaya a verse afectado. Esto permite que la composición otorgue una o más de las siguientes características favorables: ventajas de rendimiento.

- 20 **[0239]** La enzima modificada (o composición que comprende la enzima modificada) de la presente invención se puede aplicar para entremezclar, cubrir y/o impregnar un producto (p. ej., alimento para animales o ingredientes crudos de un alimento para animales) con una cantidad controlada de dicha enzima.

[0240] En una forma de realización especialmente preferida, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se homogeneiza para producir un polvo.

- 25 **[0241]** En una forma de realización alternativa preferida, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención está formulada en gránulos conforme a lo descrito en los documentos WO2007/044968 (denominados gránulos TPT) o WO1997/016076 o WO1992/012645.

- 30 **[0242]** En otra forma de realización preferida, cuando la composición de aditivo para pienso está formulada en gránulos, los gránulos comprenden una sal de barrera hidratada que recubre el núcleo proteico. La ventaja de dicho recubrimiento salino es la mejora de la tolerancia térmica, una mejor estabilidad de almacenamiento y protección frente a otros aditivos para pienso que, de lo contrario, tendrían un efecto adverso en la enzima.

[0243] Preferiblemente, la sal utilizada para el recubrimiento salino posee una actividad acuosa superior a 0,25 o una humedad constante superior al 60 % a 20 °C.

[0244] Preferiblemente, el recubrimiento de sal comprende un Na₂SO₄.

- 35 **[0245]** El método de preparación de una enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención puede comprender además la etapa posterior de granulación del polvo. El polvo se puede mezclar con otros componentes conocidos en la técnica. Se puede forzar el paso del polvo, o mezcla que comprende el polvo, a través de una matriz, y las tiras resultantes se cortan en gránulos adecuados de longitud variable.

- 40 **[0246]** De manera opcional, la etapa de granulación puede incluir un tratamiento por vapor, o etapa de acondicionamiento, con anterioridad a la formación de los gránulos. La mezcla que comprende el polvo se puede colocar en un acondicionador, p. ej., una mezcladora con inyección de vapor. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura determinada, como de 60 a 100 °C; las temperaturas normales serían 70 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C o 95 °C. El período de permanencia puede variar de segundos a minutos e incluso horas. Por ejemplo, 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 45 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

[0247] Se entenderá que la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención resulta adecuada para su adición a cualquier material para pienso adecuado.

- 50 **[0248]** Un experto en la materia podrá comprender que distintos animales precisan diferentes alimentos para animales, e incluso el mismo animal puede necesitar distintos alimentos para animales en función del propósito para el cual se haya criado el animal.

[0249] Opcionalmente, el alimento para animales puede contener además minerales adicionales tales como, por ejemplo, calcio y/o vitaminas adicionales.

[0250] Preferiblemente, el alimento para animales es una mezcla de harina de maíz y de soja.

[0251] En una forma de realización, preferiblemente, el pienso no es alimento para mascotas.

[0252] En otro aspecto, se da a conocer un método para producir un alimento para animales. El alimento para animales se produce normalmente en molinos de piensos, en los cuales las materias primas se muelen en primer lugar hasta conseguir un tamaño de partículas adecuado, y a continuación se mezclan con aditivos apropiados. El alimento para animales se puede producir posteriormente como una papilla o gránulos; este último implica normalmente un método mediante el cual se eleva la temperatura hasta un nivel deseado y, a continuación, el pienso pasa a través de una matriz para producir gránulos de un tamaño concreto. Se dejan enfriar los gránulos. Posteriormente, se pueden añadir aditivos líquidos, tales como grasa y enzima. La producción de alimento para animales puede implicar además una etapa adicional que incluye extrusión o expansión antes de la granulación; en concreto, mediante técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor.

[0253] El alimento para animales puede ser un alimento para animales destinado a un animal monogástrico, como aves (por ejemplo, pollos de engorde, gallinas ponedoras, aves reproductoras de engorde, pavos, patos, gansos, aves acuáticas), y cerdos (de todas las categorías de edad), un rumiante, tal como ganado bovino (p. ej., vacas o toros (incluyendo terneros)), caballos, ovejas, un animal de compañía (por ejemplo, perros, gatos) o peces (por ejemplo, peces agástricos, peces gástricos, peces de agua dulce como salmones, bacalaos, truchas y carpas, p. ej., la carpa koi, peces marinos tales como lubinas, y crustáceos, como gambas, mejillones y vieiras). Preferiblemente, el alimento para animales es para aves.

ALIMENTO PARA ANIMALES A BASE DE MAÍZ

[0254] En una forma de realización preferida, el alimento para animales puede ser un alimento para animales a base de maíz. El término «alimento para animales a base de maíz», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a un alimento para animales que comprende o consiste en maíz o un subproducto de maíz.

[0255] Preferiblemente, el alimento para animales a base de maíz comprende maíz o un subproducto de maíz como componente principal. Por ejemplo, el alimento para animales a base de maíz puede comprender al menos un 35 % de maíz o de un subproducto de maíz, tal como al menos un 40 % de maíz o de un subproducto de maíz, tal como al menos un 50 % de maíz o de un subproducto de maíz, tal como al menos un 60 % de maíz o de un subproducto de maíz, tal como al menos un 70 % de maíz o de un subproducto de maíz, tal como al menos un 80 % de maíz o de un subproducto de maíz, tal como al menos un 90 % de maíz o de un subproducto de maíz, por ejemplo un 100 % de maíz o de un subproducto de maíz.

[0256] En algunas formas de realización, el alimento para animales a base de maíz puede comprender maíz o un subproducto de maíz como componente secundario, en cuyo caso el alimento para animales se puede complementar con maíz o con un subproducto de maíz. A modo de ejemplo, únicamente el alimento para animales puede comprender, por ejemplo, trigo complementado con maíz o con un subproducto de maíz.

[0257] Cuando el maíz o el subproducto de maíz es un componente secundario del alimento para animales, el maíz o subproducto de maíz supone al menos un 5 %, preferiblemente al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 20 %, preferiblemente al menos un 30 % del alimento para animales.

[0258] Para evitar cualquier duda, el término «maíz», según se utiliza en el presente documento, es sinónimo de, p. ej., *Zea mays*.

[0259] En una forma de realización, el subproducto de maíz puede ser granos secos de destilería con solubles a base de maíz (cDDGS) o pasta húmeda de maíz o granos secos de destilería a base de maíz (DDG) o harina de gluten de maíz o pienso de gluten de maíz o combinaciones de estos.

[0260] En una forma de realización, preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano de la presente invención comprende un subproducto de maíz, tal como granos secos de destilería con solubles a base de maíz (cDDGS) o pasta húmeda de maíz o granos secos de destilería a base de maíz (DDG) o harina de gluten de maíz o pienso de gluten de maíz o combinaciones de los mismos.

ALIMENTO PARA ANIMALES A BASE DE TRIGO

[0261] En una forma de realización preferida, el alimento para animales puede ser un alimento para animales a base de trigo. El término «alimento para animales a base de trigo», según se utiliza en el presente documento, hace referencia a un alimento para animales que comprende o consiste en trigo o un subproducto de trigo.

[0262] Preferiblemente, el alimento para animales a base de trigo comprende trigo o un subproducto de trigo como componente principal. Por ejemplo, el alimento para animales a base de trigo puede comprender al menos un 40 % de trigo o de un subproducto de trigo, tal como al menos un 60 % de trigo o de un subproducto de trigo, tal como al menos un 80 % de trigo o de un subproducto de trigo, tal como al menos un 90 % de trigo o de un subproducto de trigo, por ejemplo, un 100 % de trigo o de un subproducto de trigo.

[0263] En algunas formas de realización, el alimento para animales a base de trigo puede comprender trigo o un subproducto de trigo como componente secundario; en este caso, el alimento para animales puede estar complementado con trigo o con un subproducto de trigo. A título de ejemplo, únicamente el alimento para animales puede comprender, por ejemplo, trigo complementado con trigo o con un subproducto de trigo.

[0264] Cuando el trigo o el subproducto de trigo es un componente secundario del alimento para animales, el trigo o subproducto de trigo es al menos un 5 %, preferiblemente al menos un 10 %, preferiblemente al menos un 20 %, preferiblemente al menos un 30 % del alimento para animales.

5 [0265] En una forma de realización, el subproducto de trigo puede ser, por ejemplo, salvado de trigo, harinillas de trigo, fibras de trigo.

10 [0266] El salvado es la capa externa dura del grano, y consiste en una combinación de aleurona y pericarpio. Junto con el germen, es una parte integrante de los granos enteros, y se suele producir como un subproducto de la molienda en la producción de granos refinados. Cuando se retira el salvado de los granos, los granos pierden una parte de su valor nutricional. El salvado está presente y se puede moler en cualquier grano de cereal, incluyendo arroz, maíz, trigo, avena, cebada y mijo. El salvado es especialmente rico en fibra dietética y ácidos grasos esenciales, y contiene cantidades significativas de almidón, proteína, vitaminas y minerales.

[0267] Las harinillas de trigo son partículas gruesas y finas de salvado de trigo y partículas finas de moyuelos de trigo, germen de trigo, harina de trigo y desperdicios de la «cola del molino».

15 [0268] Las harinillas de trigo son un subproducto económico intermedio entre la alimentación humana y los piensos para animales. En una forma de realización, preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano de la presente invención comprende salvado de trigo y/o harinillas de trigo.

PASTA HÚMEDA, GRANOS SECOS DE DESTILERÍA (DDG) Y GRANOS SECOS DE DESTILERÍA CON SOLUBLES (DDGS)

20 [0269] La pasta húmeda, los granos secos de destilería y los granos secos de destilería con solubles son productos obtenidos tras la extracción de alcohol etílico mediante la destilación procedente de la fermentación de levadura de un grano o de una mezcla de granos por medio de métodos empleados en la industria de la destilación de granos.

[0270] El residuo de destilación procedente de la destilación (p. ej., que comprende agua, restos del grano, células de levadura, etc.) se separa en una parte «sólida» y una parte líquida.

25 [0271] La parte sólida se denomina «pasta húmeda» y, como tal, se puede utilizar como pienso para animales.

[0272] La parte líquida se evapora (parcialmente) en un jarabe (solubles).

[0273] Cuando la pasta húmeda se seca, se trata de granos secos de destilería (DDG).

[0274] Cuando la pasta húmeda se seca junto con el jarabe (solubles), se trata de granos secos de destilería con solubles (DDGS).

30 [0275] La pasta húmeda se puede utilizar en instalaciones lecheras y cebaderos de ganado vacuno.

[0276] Los DDGS secos se pueden utilizar en piensos para el ganado (p. ej., ganado lechero, bovino y porcino) y en piensos para aves.

[0277] Los DDGS de maíz son una muy buena fuente de proteínas para las vacas lecheras.

HARINA DE GLUTEN DE MAÍZ

35 [0278] En un aspecto, el subproducto de maíz puede ser harina de gluten de maíz (HGM).

[0279] La HGM es un subproducto en polvo de la industria de molienda de maíz. La HGM se puede utilizar, por ejemplo, en pienso para animales. Se puede utilizar como una fuente de proteínas económica para piensos, como alimento para mascotas, pienso para ganado y pienso destinado a aves. Es una fuente especialmente buena del aminoácido cisteína, pero se debe equilibrar con otras proteínas para la lisina.

COMPOSICIÓN DE ADITIVO PARA PIENSO

[0280] La composición de aditivo para pienso de la presente invención y/o el alimento para animales que comprende el mismo se puede utilizar en cualquier forma adecuada.

45 [0281] La composición de aditivo para pienso de la presente invención se puede utilizar en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de las mismas. Entre los ejemplos de preparaciones sólidas se incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, bolitas, pastillas, polvillo y gránulos que pueden ser humectables, secados por pulverización o liofilizados. Entre los ejemplos de preparaciones líquidas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuosas y orgánicas.

[0282] En algunas aplicaciones, las composiciones de aditivo para pienso de la presente invención se pueden mezclar con pienso o se pueden administrar en el agua potable.

50 [0283] En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una composición de aditivo para pienso, comprendiendo mezclar una xilanasada dada a conocer en el presente documento con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable para piensos, y (opcionalmente) realizar el envasado.

PREMEZCLA

[0284] La composición de alimento para animales y/o de aditivo para pienso se puede combinar con al menos un mineral y/o al menos una vitamina. Así, se puede hacer referencia en el presente documento a las composiciones derivadas como una premezcla.

5 MALTEADO Y ELABORACIÓN DE CERVEZA

[0285] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, según la presente invención (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se puede utilizar en el malteado y la elaboración de cerveza.

10 **[0286]** Los granos de cebada contienen de un 1,7 a un 4,1 % (peso/peso) de betaglucano extraíble en agua y de un 3,6 a un 6,4 % (peso/peso) de betaglucano total (Anderson, M.A., Cook, J.A., y Stone, B.A., Journal of the Institute of Brewing, 1978, 84, 233-239; Henry, J., Journal of the Science of Food and Agriculture, 1985, 36, 1243).

[0287] Los granos de trigo contienen de un 0,1 a un 0,8 % (peso/peso) de betaglucano extraíble en agua y de un 0,6 a un 1,4 % (peso/peso) de betaglucano total (Anderson, M.A. *et al.* (1978), *supra*).

15 **[0288]** La hidrólisis eficiente de arabinoxilanos (AXsol) y betaglucano es importante debido a que tales compuestos pueden estar implicados en problemas de producción, tales como la viscosidad del mosto (Ducroo, P. y Frelon, P.G., Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Zürich, 1989, 445; Viëtor, R.J. y Voragen, A.G.J., Journal of the Institute of Brewing, 1993, 99, 243) y la filtrabilidad y la formación de turbidez (Coote, N. y Kirsop, B.H. 1976., Journal of the Institute of Brewing, 1976, 82, 34; Izawa, M., Kano, Y. y Kanimura, M. 1991. Proceedings Aviemore Conference on Malting, brewing and Distilling, 1990, 427).

[0289] La presente invención expone un método para hidrolizar arabinoxilanos (p. ej., AXinsol y AXsol) durante el malteado y la elaboración de cerveza, donde los granos de trigo, los granos de cebada, o una combinación de los mismos, o fracciones de los granos de trigo y/o de cebada, se mezclan con la xilanasa modificada de la presente invención.

25 **[0290]** En un aspecto de la presente invención, se puede hacer referencia a una composición alimenticia que es una bebida, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, una bebida fermentada, tal como cerveza y vino, que comprende una enzima que presenta actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención.

30 **[0291]** En otro aspecto de la presente invención, se puede hacer referencia a una composición alimenticia que es una bebida, incluyendo, aunque sin carácter limitativo, una bebida fermentada tal como cerveza y vino, que comprende una xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención.

[0292] En el contexto de la presente invención, el término «bebida fermentada» está pensado para comprender cualquier bebida producida mediante un método que comprenda un proceso de fermentación, tal como una fermentación microbiana, p. ej., una fermentación bacteriana y/o de levadura.

35 **[0293]** En un aspecto de la invención, la bebida fermentada es cerveza. El término «cerveza» comprende cualquier mosto fermentado producido mediante fermentación/destilación de un material vegetal que contiene almidón. A menudo, la cerveza se produce a partir de malta o adjunto, o cualquier combinación de malta y adjunto, como el material vegetal que contiene almidón. Según se utiliza en el presente documento, se entiende por el término «malta» cualquier grano de cereal malteado, como cebada malteada o trigo malteado.

40 **[0294]** Según se utiliza en el presente documento, el término «adjunto» se refiere a cualquier material vegetal que contenga almidón y/o azúcar que no sea malta, tal como malta de cebada o de trigo. Como ejemplos de adjuntos se pueden mencionar materiales tales como sémola de maíz común, sémola de maíz refinada, levadura de cerveza molida, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarillada, trigo, almidón de trigo, cereal torrefacto, copos de cereales, centeno, avena, maíz, patata, tapioca, mandioca y jarabes, tales como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o de trigo y similares, que se pueden utilizar como fuente de almidón.

45 **[0295]** Según se utiliza en el presente documento, el término «papilla» se refiere a una suspensión acuosa de cualquier material vegetal que contenga almidón y/o azúcar, tal como malta molida, p. ej., que comprenda malta de cebada triturada, cebada triturada y/u otro adjunto o una combinación de los mismos, que se mezcla posteriormente con agua para separarse en mosto y bagazo.

[0296] Según se utiliza en el presente documento, el término «mosto» se refiere al extracto de licor no fermentado tras la extracción de la malta molida durante la maceración.

[0297] En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación de una bebida fermentada, tal como cerveza, que comprende mezclar la xilanasa modificada de la presente invención con malta o adjunto.

55 **[0298]** Ejemplos de cervezas comprenden: cerveza de pura malta, cerveza elaborada de acuerdo con el «Reinheitsgebot» o ley de pureza de 1516, cerveza de fermentación alta o *ale*, IPA, cerveza de fermentación

baja o *lager*, cerveza amarga o *bitter*, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, bebida afín a la cerveza, cerveza ligera, cerveza de bajo contenido alcohólico, cerveza baja en calorías, cerveza *porter*, cerveza *bock*, cerveza negra, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol y similares, aunque también bebidas alternativas a base de malta y cereales, tales como bebidas a base de malta con sabor a fruta, por ejemplo, con sabor a cítrico, tal como limón, naranja, lima, o bebidas a base de malta con sabor a bayas, bebidas a base de malta con sabor a licor, por ejemplo, licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila, o bebidas a base de malta con sabor a café, tal como licor a base de malta con sabor a cafeína y similares.

DESCOMPOSICIÓN DE MATERIAL A BASE DE CEREALES PARA, POR EJEMPLO, PRODUCIR BIOCOMBUSTIBLE

[0299] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la enzima) se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol o AXsol durante el procesamiento de granos de, por ejemplo, material a base de cereales. El material a base de cereales puede ser granos enteros (p. ej., granos integrales de trigo, cebada, centeno, triticale o maíz o mezclas de los mismos) o porciones de los granos enteros, o mezclas de los mismos.

[0300] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la enzima) se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol en materiales a base de cereales o granos enteros.

[0301] Para evitar cualquier duda, los granos enteros se pueden romper de forma mecánica.

[0302] El material a base de cereales se puede descomponer o degradar en glucosa. Posteriormente, la glucosa se puede utilizar como materia prima para cualquier proceso de fermentación, p. ej., para la producción de biocombustible (p. ej., bioetanol) y/o sustancias bioquímicas (p. ej., isopreno biológico).

[0303] El material a base de cereales puede ser materia prima para un proceso de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol).

[0304] Hoy en día, la mayor parte del etanol combustible se produce a partir de granos de maíz, que se muelen o se trituran, se tratan con enzimas amilasas para hidrolizar almidón en azúcares, se fermentan y se destilan. A pesar de que se han logrado avances significativos en cuanto a la reducción de costes de producción del etanol, siguen existiendo desafíos pendientes. Se necesitan todavía técnicas mejoradas para reducir el coste de las materias primas de los biocombustibles para la producción de etanol. Por ejemplo, en la producción de etanol a base de cereales, la degradación de arabinoxilanos puede incrementar la accesibilidad del almidón.

[0305] La presente invención expone una xilanasa modificada para su uso en la descomposición de hemicelulosas, p. ej., arabinoxilano, especialmente AXinsol y AXsol.

[0306] Solo a modo de ejemplo, en la industria europea del alcohol para combustible, los pequeños granos como el trigo, la cebada y el centeno son materias primas habituales, mientras que en EE. UU. se utiliza principalmente el maíz. El trigo, la cebada y el centeno contienen, junto al almidón, niveles altos de polímeros polisacáridos no amiláceos (PNA), como celulosa, betaglucano y hemicelulosa.

[0307] La proporción con la que están representados los distintos PNA difiere para cada materia prima. La siguiente tabla muestra las distintas cantidades de PNA en trigo, cebada y centeno en comparación con algunas otras materias primas.

Tabla 1: Polisacáridos no amiláceos presentes en distintas materias primas (g kg⁻¹ de materia seca)

	Maíz	Trigo	Centeno	Cebada		Avena	
				Con cascarilla	Sin cascarilla	Con cascarilla	Sin cascarilla
Betaglucano	1	8	16	42	42	28	41
Celulosa	22	17-20	15-16	43	10	82	14
PNC ¹ solubles y no solubles	75	89-99	116-136	144	114	150	113

	Maíz	Trigo	Centeno	Cebada		Avena	
				Con cascarilla	Sin cascarilla	Con cascarilla	Sin cascarilla
Total de PNA	97	107-119	132-152	186	124	232	116
Polisacáridos no celulósicos: pentosanós, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas							

[0308] Los PNA pueden aportar una elevada viscosidad a las papillas de cereales. La viscosidad alta posee un efecto negativo en la producción de etanol, puesto que limitará la concentración de sólidos que se puede utilizar en la maceración y reducirá la eficiencia energética del proceso. Además, las hemicelulosas residuales presentes a lo largo del proceso pueden contribuir a formar incrustaciones en los intercambiadores de calor y en el equipo de destilación. El efecto más grande de una viscosidad elevada se observa cuando una papilla se enfría hasta la temperatura de fermentación (32 °C). Esto explica que sea necesario reducir la viscosidad en el proceso en cualquier punto anterior a la etapa de enfriamiento.

[0309] En una forma de realización de la presente invención, el método para degradar material a base de cereales comprende mezclar la xilanasa modificada según se da a conocer en el presente documento tan pronto como sea posible en el proceso de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol), por ejemplo, preferiblemente durante la mezcla del material a base de cereales al principio del proceso. Una ventaja de añadir las xilanasas modificadas, según se da a conocer en el presente documento, en una etapa temprana del proceso es que las enzimas descomponen la viscosidad inicial.

[0310] En una forma de realización de la presente invención, el método para degradar material a base de cereales comprende mezclar la xilanasa modificada, según se da a conocer en el presente documento, antes o durante la licuefacción, sacarificación, fermentación, sacarificación y fermentación simultáneas, posfermentación o una combinación de las mismas.

[0311] Por consiguiente, en una forma de realización, la presente invención se refiere a la reducción de la viscosidad al degradar materiales a base de cereales, por ejemplo, en procesos de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol).

[0312] Las ventajas de utilizar la enzima que posee actividad xilanasas, p. ej., la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y dada a conocer en el presente documento, para reducir la viscosidad al degradar materiales a base de cereales, por ejemplo, en procesos de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol), son múltiples:

- Se puede utilizar una papilla con una mayor cantidad de sustancia seca en el proceso
- Se puede obtener un contenido más elevado de sólidos del jarabe final
- Mejor transferencia de calor, menor necesidad de energía
- Reducción de las incrustaciones en el evaporador, lo cual deriva en una reducción de los costes de limpieza
- Incremento de rendimientos finales del etanol
- Calidad mejorada de DDGS (subproducto)
- Mejor separación entre la parte sólida y la líquida durante la separación del residuo de destilación (tras la destilación). La menor viscosidad incrementa la eficiencia de separación.

[0313] Otra ventaja significativa de la presente invención es que el uso de la enzima que posee actividad xilanasas, p. ej., la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, en la producción de biocombustible puede dar como resultado además (sub)productos mejorados derivados de ese proceso, tales como pasta húmeda, granos secos de destilería (DDG) o granos secos de destilería con solubles (DDGS). Por lo tanto, como ventaja de la presente invención, debido a que la pasta húmeda, DDG y DDGS son (sub)productos de la producción de biocombustible (p. ej., bioetanol), el uso de la presente invención puede dar como resultado una mejor calidad de estos (sub)productos. Por ejemplo, los arabinoxilanos presentes en los (sub)productos pueden estar ya disueltos durante el proceso de producción de biocombustible.

SEPARACIÓN DE GLUTEN DE CEREAL (POR EJEMPLO, TRIGO) Y ALMIDÓN

[0314] La enzima que posee actividad xilanasas, p. ej., la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que

comprende la enzima) de la presente invención o dada a conocer en el presente documento se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol durante la separación de almidón de trigo y gluten.

5 **[0315]** Tras la separación inicial del salvado y el germen de trigo del endospermo, el fraccionamiento de la harina de endospermo de trigo en fracciones de almidón y gluten se aplica industrialmente a gran escala para obtener almidón A de alta calidad y subproductos almidón B y gluten vital.

[0316] El producto de la degradación de la harina de cereales (p. ej., harina de trigo) en la presente invención es almidón (almidón A de alta calidad).

10 **[0317]** Además, se producen también subproductos almidón B y gluten vital. A continuación, cada producto individual se procesa además para complementar o modificar las características del producto alimenticio conforme a las necesidades del mercado.

15 **[0318]** Existen varios procesos de separación de trigo utilizados por la industria y descritos en la literatura. Estos procesos industriales difieren principalmente en las formas de las mezclas de harina y agua expuestas al equipo de fraccionamiento (centrífuga, hidrociclón o tamiz) o en las condiciones de reacción iniciales, como la temperatura y la aplicación de corte (Abdulahit Sayaslan, Lebensm.-Wiss. U.-Technol 37 (2004) 499-515, Wetmilling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods).

20 **[0319]** En el método para separar una harina de cereales (p. ej., harina de trigo) en fracciones de almidón y gluten, el método comprende mezclar una harina de cereales (p. ej., harina de trigo), agua y una xilanasa modificada. La harina de cereales, el agua y la xilanasa modificada se pueden mezclar de manera simultánea o sucesiva. En algunas formas de realización, la harina de cereales (p. ej., harina de trigo) y el agua se pueden mezclar antes de mezclarse con la xilanasa modificada.

[0320] Por lo general, la harina de cereales (p. ej., harina de trigo) se mezcla hasta obtener una masa o bien una masa líquida, con sólidos secos que varían entre un 35 y un 63 %, a temperaturas de ~ 20-45 °C. A continuación, la mezcla se procesa, además:

25 1) dejando reposar la mezcla durante cierto tiempo (~30 minutos) y retirando seguidamente el almidón de la mezcla utilizando un tamiz, centrífuga o hidrociclón para separar la lechada de almidón del gluten, o

2) aplicando corte en la mezcla, diluyendo además opcionalmente la mezcla y separando a continuación la harina de trigo mediante un hidrociclón, o una centrífuga decantadora bifásica o trifásica.

[0321] El término «sólidos secos», según se utiliza en el presente documento, se refiere al total de sólidos (disueltos y no disueltos) de una suspensión (en %) expresado en peso seco.

30 **[0322]** En una forma de realización de la presente invención, el método o uso reivindicado puede incluir las etapas de mezclar la harina de trigo para formar una masa o masa líquida con entre un 35 y un 63 % de sólidos secos, a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 45 °C, y separar el almidón del gluten.

[0323] El método de la presente invención puede comprender, además:

35 a) reposar la mezcla durante aproximadamente 30 minutos y retirar sucesivamente el almidón de la mezcla utilizando un tamiz, una centrífuga o bien un hidrociclón para separar la lechada de almidón del gluten; o

b) aplicar corte en la mezcla y, además, opcionalmente, diluir la mezcla, separar el almidón del gluten utilizando un hidrociclón o una centrífuga decantadora bifásica o trifásica.

40 **[0324]** La presente invención contempla mejorar la separación del almidón y el gluten añadiendo una enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, convenientemente durante la etapa inicial de mezclado de harina y agua en los diversos procesos descritos anteriormente que se utilizan para la separación del almidón de trigo. La separación se mejora añadiendo una xilanasa modificada durante la etapa inicial de mezclado, debido a la reducción de la viscosidad y a la hidrólisis de AXsol y/o AXinsol que interfiere con las partículas de gluten. Al degradar estos polisacáridos y oligosacáridos, se potencia la aglomeración de gluten, mejorando el rendimiento del gluten. (S.A. Frederix, C.M. Courtin, J.A. Delcour, J. Cereal Sci. 40 (2004) 41-49, *Substrate selectivity and inhibitor sensitivity affect xylanase functionality in wheat flour gluten-starch separation*).

[0325] Una ventaja de la presente invención es que da como resultado mejores rendimientos de almidón A y/o gluten de mejor calidad (p. ej., gluten vital de mejor calidad).

[0326] Una ventaja de la presente invención es que mejora la separación de gluten de trigo y almidón.

50 **[0327]** Una de las formas de evaluación de la calidad del gluten es monitorizando la aglomeración de gluten. Cuando se aplica una cierta cantidad de fricción a través del amasado de la masa o mezclando la masa líquida, las partículas de gluten tienden a aglomerarse en partículas más grandes que forman una red polimérica, denominada «gluten vital». Se puede añadir «gluten vital» a productos alimenticios para mejorar propiedades de productos de panadería, tales como la fuerza de la masa, el período de conservación y el volumen del pan (L.

Day, M.A. Augustin, I.L. Batey y C. W. Wrigley; Wheat-gluten uses and industry needs; Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 82-90).

[0328] En la industria panadera, la calidad y la cantidad del gluten en una harina de trigo se determina mediante el ensayo estándar ICC n.º 155 (AACC 38-12) utilizando un sistema Glutomatic. En este dispositivo, se forma una masa a partir de harina de trigo (10,0 g) mezclada con una pequeña cantidad de solución de NaCl al 2 % (4,2 - 4,8 ml). Tras la etapa de mezclado de 20 segundos de duración, la masa se amasa continuamente mientras se lava durante 5 minutos con una solución de NaCl al 2 % a temperatura ambiente (~22 °C) bombeada a través del vaso de mezcla con un caudal de ~70 ml/minuto. Durante esta etapa de lavado, se recoge el agua de lavado que contiene almidón y las partículas de gluten forman una bola de gluten en el interior del soporte de la criba Glutomatic.

[0329] La calidad del gluten se mide evaluando la aglomeración de gluten. Esto se lleva a cabo centrifugando la bola de gluten en una centrífuga especial que contiene una pequeña criba. Las partículas de gluten que pasan a través de esta criba se pesan (gluten pequeño) y se pesa la cantidad total de gluten. El índice de gluten se calcula mediante $(\text{gluten húmedo total} - \text{gluten húmedo pequeño}) / \text{gluten húmedo total}$. Cuanto más se mejore la aglomeración del gluten, más pequeña será la fracción de gluten pequeño y más elevado será el valor del índice de gluten. Un alto índice de gluten, con un máximo teórico de 100 %, indica una bola de gluten de alta calidad.

[0330] Otro valor para cuantificar la cantidad de gluten es el rendimiento del gluten seco (%). Este valor se calcula dividiendo los gramos de gluten seco total por la cantidad total de harina seca que se utilizó en el experimento. Cuanto más gluten seco se recupera, mejor es la separación.

Actualmente, este ensayo industrial está siendo adaptado para simular un proceso de separación de masa empleado en la industria.

DOSIS

[0331] Preferiblemente, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, se encuentra en el material que contiene xilano (p. ej., alimento para animales) en el intervalo de aproximadamente 500 XU/kg a aproximadamente 16 000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), más preferiblemente de aproximadamente 750 XU/kg de pienso a aproximadamente 8000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), preferiblemente de aproximadamente 1500 XU/kg de pienso a aproximadamente 3000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), preferiblemente de aproximadamente 2000 XU/kg de pienso a aproximadamente 2500 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso) a aproximadamente 4000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso).

[0332] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, se encuentra en el material que contiene xilano (p. ej., alimento para animales) en más de aproximadamente 500 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente más de aproximadamente 600 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente más de aproximadamente 700 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente más de aproximadamente 800 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente más de aproximadamente 900 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente más de aproximadamente 1000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente más de aproximadamente 2000 XU/kg, convenientemente más de aproximadamente 2500 XU/kg, convenientemente más de aproximadamente 3000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso).

[0333] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención, se encuentra presente en el material que contiene xilano (p. ej., alimento para animales) en una concentración de entre aproximadamente 2000 XU/kg y aproximadamente 2500 XU/kg.

[0334] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, se encuentra presente en el material que contiene xilano (p. ej., alimento para animales) en menos de aproximadamente 16 000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente en menos de aproximadamente 8000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente en menos de aproximadamente 7000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente en menos de aproximadamente 6000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente en menos de aproximadamente 5000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso), convenientemente en menos de aproximadamente 4000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., pienso).

[0335] Preferiblemente, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, puede estar presente en una composición de aditivo para pienso en un intervalo de aproximadamente 100 XU/g a

aproximadamente 320 000 XU/g de composición, más preferiblemente de aproximadamente 300 XU/g de composición a aproximadamente 160 000 XU/g de composición, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 50 000 XU/g de composición, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 40 000 XU/g de composición.

[0336] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención, se encuentra en la composición de aditivo para pienso en más de aproximadamente 100 XU/g de composición, convenientemente más de aproximadamente 200 XU/g de composición, convenientemente más de aproximadamente 300 XU/g de composición, convenientemente más de aproximadamente 400 XU/g de composición, convenientemente más de aproximadamente 500 XU/g de composición.

[0337] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, se encuentra presente en la composición de aditivo para pienso en menos de aproximadamente 320 000 XU/g de composición, convenientemente menos de aproximadamente 160 000 XU/g de composición, convenientemente menos de aproximadamente 50 000 XU/g de composición, convenientemente menos de aproximadamente 40 000 XU/g de composición, convenientemente menos de aproximadamente 30 000 XU/g de composición.

[0338] La actividad xilanasa se puede expresar en unidades de xilanasa (XU) medidas en pH 5.0 con AZCL-arabinoxilano (arabinoxilano de trigo entrecruzado con azurina, comprimidos de Xylazyme, Megazyme) como sustrato. La hidrólisis mediante endo-(1-4)- β -D-xilanasa (xilanasa) produce fragmentos teñidos hidrosolubles, y la proporción de liberación de estos (incremento de la absorbancia en 590 nm) puede estar relacionada directamente con la actividad enzimática. Las unidades de xilanasa (XU) se determinan en relación con una enzima estándar (xilanasa de Danisco, disponible a través de Danisco Animal Nutrition) en condiciones de reacción convencionales, que son 40 °C, 5 min de tiempo de reacción en tampón McIlvaine, pH 5.0.

[0339] La actividad xilanasa de la enzima estándar se determina como la cantidad de grupos terminales de azúcar reductor liberados de un sustrato de avena-espelta-xilano por minuto con pH 5.3 y a 50 °C. Los grupos terminales de azúcar reductor reaccionan con ácido 3,5-dinitrosalicílico y la formación del producto de reacción se puede medir como un incremento de la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica en relación con una curva estándar de xilosa (equivalentes de azúcar reductor). Una unidad de xilanasa (XU) es la cantidad de enzima estándar que libera 0,5 μ mol de equivalentes de azúcar reductor por minuto con pH 5.3 y a 50 °C.

[0340] En una forma de realización, la enzima se clasifica, convenientemente, utilizando la clasificación E.C. anteriormente descrita, y la clasificación E.C. designa una enzima que posee esa actividad al analizarse en el ensayo dado a conocer en el presente documento para determinar 1 XU.

[0341] Preferiblemente, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, se encuentra presente en la etapa de mezclado de un proceso de separación de almidón de trigo en la masa o en la masa líquida en el intervalo de aproximadamente 0,01 kg/MT DS de masa o masa líquida a aproximadamente 0,60 kg/MT DS, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 kg/MT DS a aproximadamente 0,45 kg/MT DS de masa o masa líquida, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,10 kg/MT DS a aproximadamente 0,25 kg/MT DS de masa o masa líquida.

[0342] En algunas formas de realización (especialmente en la forma de realización de separación de almidón de trigo), la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, puede estar dosificada en el intervalo de aproximadamente 0,019 g de proteína/MT DS de harina de trigo (que equivale a 0,019 mg/kg DS) a aproximadamente 119 g de proteína/MT DS de harina de trigo (que equivale a 119 mg/kg DS, donde DS significa contenido de sólidos secos y MT significa tonelada métrica).

[0343] En algunas formas de realización (especialmente en la forma de realización de separación de almidón de trigo), la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, puede estar dosificada en aproximadamente 1,19 g de proteína/MT DS de harina de trigo (que equivale aproximadamente a 1,19 mg/kg DS, donde DS significa contenido de sólidos secos y MT significa tonelada métrica).

[0344] En algunas formas de realización (especialmente en la forma de realización de separación de almidón de trigo), la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede estar dosificada en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 120 000 unidades/kg de harina de trigo, convenientemente entre aproximadamente 500-2400 unidades/kg de harina de trigo, convenientemente entre aproximadamente 900-1200 unidades/kg de harina de trigo (donde 1 unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 4).

5 **[0345]** En algunas formas de realización (especialmente al degradar material a base de cereales), la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención, puede estar dosificada en el intervalo de aproximadamente 0,29 g/proteína/MT DS de trigo (que equivale a 0,29 mg/kg de DS) a aproximadamente 0290 g/proteína/MT DS de trigo (que equivale a 290 mg/kg de DS).

[0346] En algunas formas de realización (especialmente al degradar material a base de cereales), la xilanasa puede estar en dosis de 2,9 g/proteína/MT DS de trigo (que equivale a 2,9 mg/kg de DS).

10 **[0347]** En algunas formas de realización (especialmente al degradar material a base de cereales), la xilanasa puede estar dosificada en el intervalo de aproximadamente 22 a aproximadamente 285 000 unidades/kg, convenientemente de aproximadamente 1100 a aproximadamente 5700 unidades/kg, convenientemente de aproximadamente 2200 a aproximadamente 2850 unidades/kg (donde 1 unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 4).

15 **[0348]** La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición que comprende la enzima de acuerdo con la presente invención, puede estar diseñada para una dosis única o puede estar diseñada para su uso (p. ej., en alimentación) a diario.

20 **[0349]** La cantidad óptima de la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición que comprende la enzima que se va a utilizar en la presente invención dependerá del producto que se va a tratar y/o del método de contacto del producto con la composición y/o del uso previsto para el mismo.

[0350] La cantidad de enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta, de la presente invención empleada en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para que resulte efectiva.

25 **[0351]** La cantidad de enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta, de la presente invención, empleada en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para que resulte efectiva y para que continúe siendo lo suficientemente efectiva, por ejemplo, para mejorar el rendimiento de un animal alimentado con los productos de pienso que contienen dicha composición. Esta cantidad de tiempo de efectividad se debería extender hasta al
30 menos el período de utilización del producto (p. ej., composición de aditivo para pienso o pienso que contiene la misma).

FORMULACIÓN

35 **[0352]** En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención puede estar formulada como un líquido, un polvo seco o un gránulo.

[0353] El polvo seco o gránulos se puede(n) preparar a través de medios conocidos para los expertos en la técnica, tales como en recubrimiento en lecho fluido con rociado superior, en un rociado inferior Wurster o mediante granulación en tambor (p. ej., granulación de alto corte), extrusión, revestimiento en tambor o en una mezcladora de microingredientes.

40 **[0354]** Para algunas formas de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención puede estar recubierta; por ejemplo, encapsulada.

[0355] En una forma de realización, el recubrimiento protege a la enzima modificada frente al calor y se puede considerar un termoprotector.

45 **[0356]** En una forma de realización, la composición de aditivo para pienso está formulada como un polvo seco o en gránulos, según se describe en el documento WO2007/044968 (denominados gránulos TPT) o WO1997/016076 o WO1992/012645.

50 **[0357]** En una forma de realización, la composición de aditivo para pienso puede estar formulada como un gránulo para composiciones de pienso comprendiendo: un núcleo; un agente activo; y al menos un recubrimiento, conservando el agente activo del gránulo al menos un 50 % de actividad, al menos un 60 % de actividad, al menos un 70 % de actividad, al menos un 80 % de actividad tras condiciones seleccionadas de entre una o más de a) un proceso de granulación de pienso, b) un proceso de pretratamiento para pienso con calentamiento por vapor, c) almacenamiento, d) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla sin granular, y e) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla a base de pienso o una premezcla de pienso
55 que comprende al menos un compuesto seleccionado de entre oligoelementos, ácidos orgánicos, azúcares reductores, vitaminas, cloruro de colina y compuestos que dan como resultado una mezcla a base de pienso o premezcla de pienso ácida o básica.

[0358] En lo que respecta al gránulo, al menos un recubrimiento puede comprender un material hidratante de humedad que constituya al menos un 55 % peso/peso del gránulo; y/o al menos un recubrimiento puede comprender dos recubrimientos. Los dos recubrimientos pueden ser un recubrimiento hidratante de humedad y un recubrimiento de barrera de humedad. En algunas formas de realización, el recubrimiento hidratante de

5

[0359] El gránulo se puede producir utilizando un proceso de granulación de pienso, y el proceso de pretratamiento de pienso se puede llevar a cabo entre 70 °C y 95 °C durante hasta varios minutos, por ejemplo, entre 85 °C y 95 °C.

10

[0360] En una forma de realización, la composición de aditivo para pienso se puede formular como un gránulo de pienso para animales comprendiendo: un núcleo; un agente activo, conservando el agente activo del gránulo al menos un 80 % de actividad tras el almacenamiento y tras un proceso de granulación con calentamiento por vapor en el cual el gránulo es un ingrediente; un recubrimiento de barrera de humedad; y un recubrimiento hidratante de humedad que supone al menos un 25 % peso/peso del gránulo, presentando el gránulo una actividad acuosa inferior a 0,5 con anterioridad al proceso de granulación con calentamiento por vapor.

15

[0361] El gránulo puede presentar un recubrimiento de barrera de humedad seleccionado de entre polímeros y gomas, y el material hidratante de humedad puede ser una sal inorgánica. El recubrimiento hidratante de humedad puede suponer entre un 25 % y un 45 % peso/peso del gránulo, y el recubrimiento de barrera de humedad puede suponer entre un 2 % y un 10 % peso/peso del gránulo.

20

[0362] El gránulo se puede producir utilizando un proceso de granulación con calentamiento por vapor que se puede llevar a cabo a una temperatura de entre 85 °C y 95 °C durante hasta varios minutos.

[0363] En algunas formas de realización, la enzima se puede diluir utilizando un diluyente, como un polvo de almidón, piedra caliza o similar.

25

[0364] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima se encuentra en una formulación líquida adecuada para el consumo; preferiblemente, dicho consumo de líquido contiene uno o más de los siguientes: un tampón, sal, sorbitol y/o glicerol.

30

[0365] En otra forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima se puede formular aplicando, p. ej., rociando, la(s) enzima(s) sobre un sustrato portador, tal como, por ejemplo, trigo triturado.

[0366] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima de acuerdo con la presente invención se puede formular como una premezcla. A modo de ejemplo, solo la premezcla puede comprender uno o más componentes de pienso, tales como uno o más minerales y/o una o más vitaminas.

35

[0367] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, para su uso en la presente invención, se formula con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado de entre al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato de calcio), ciclodextrina, trigo o un componente del trigo, sacarosa, almidón, Na₂SO₄, talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbato, glicerol, sacarosa, propilenglicol, 1,3-propanodiol, glucosa, parabenos, cloruro de sodio, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.

40
45

ENVASADO

[0368] En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición que comprende la misma (p. ej., composición de aditivo para pienso) y/o la premezcla y/o el pienso o alimento para animales de acuerdo con la presente invención se envasa.

50

[0369] En una forma de realización preferida, la composición de aditivo para pienso y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales está envasada en una bolsa, tal como una bolsa de papel.

[0370] En una forma de realización alternativa, la composición de aditivo para pienso y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales puede estar sellado/a en un recipiente. Se puede utilizar cualquier recipiente adecuado.

55

FORMAS

[0371] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima (p. ej., la composición de aditivo para pienso) de la presente invención y otros componentes y/o el alimento para animales que comprende la misma se puede utilizar en cualquier forma adecuada.

[0372] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la misma (p. ej., composición de aditivo para pienso) de la presente invención se puede utilizar en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de las mismas. Entre los ejemplos de preparaciones sólidas se incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, bolitas, pastillas, píldoras, cápsulas, óvalos, soluciones o suspensiones, polvillo, y gránulos que pueden ser humectables, secados por pulverización o liofilizados. Entre los ejemplos de preparaciones líquidas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuosas y orgánicas.

[0373] La composición que comprende la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta de la presente invención puede contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, rítmica o controlada.

[0374] A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se utiliza en forma sólida, p. ej., granulada, puede contener además uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina; disgregantes, tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos; aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia; y se pueden incluir agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

[0375] Entre los ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para su uso en la preparación de las formas se incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, petrolato, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de éter de petróleo, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, y similares.

[0376] Entre los excipientes preferidos para las formas se incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles con alto peso molecular.

[0377] Para suspensiones acuosas y/o elixires, la composición de la presente invención se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión, y con diluyentes tales como agua, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

SUJETO

[0378] El término «sujeto», según se utiliza en el presente documento, se refiere a un animal al que se le va a administrar o se le ha administrado una xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención o una composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención o un alimento para animales que comprende dicha composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención.

[0379] El término «sujeto», según se utiliza en el presente documento, se refiere a un animal.

[0380] En una forma de realización, el sujeto es un mamífero, ave, pez o crustáceo, incluidos, por ejemplo, ganado o un animal doméstico (p. ej., una mascota).

[0381] En una forma de realización, el «sujeto» es ganado.

[0382] El término «ganado», según se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier animal de granja. Preferiblemente, el ganado es uno o más de rumiantes tales como ganado bovino (p. ej., vacas o toros (incluidos terneros)), animales monogástricos tales como aves (incluidos pollos de engorde, pollos y pavos), cerdos (incluidos lechones), pájaros, animales acuáticos tales como peces, peces agástricos, peces gástricos, peces de agua dulce tales como salmones, bacalaos, truchas y carpas, p. ej., carpa koi, peces marinos tales como lubinas, y crustáceos, tales como gambas, mejillones y vieiras), caballos (incluidos caballos de carreras), ovejas (incluidos corderos).

[0383] En otra forma de realización, el «sujeto» es un animal domesticado o mascota o un animal mantenido en un entorno zoológico.

[0384] El término «animal domesticado o mascota o animal mantenido en un entorno zoológico», según se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier animal pertinente, incluidos cánidos (p. ej., perros), felinos (p. ej., gatos), roedores (p. ej., cobayas, ratas, ratones), pájaros, peces (incluidos peces de agua fría y peces marinos), y caballos.

RENDIMIENTO

5 **[0385]** Según se utiliza en el presente documento, el «rendimiento del animal» se puede determinar mediante la eficiencia del pienso y/o el aumento de peso del animal y/o mediante el índice de conversión del pienso y/o mediante la digestibilidad de un nutriente en un pienso (p. ej., digestibilidad de aminoácidos) y/o la energía digerible o energía metabolizable en un pienso y/o mediante la retención de nitrógeno y/o mediante la capacidad de los animales para evitar los efectos negativos de la enteritis necrótica y/o mediante la respuesta inmune del sujeto.

[0386] Preferiblemente, el «rendimiento del animal» se determina mediante la eficiencia del pienso y/o el aumento de peso del animal y/o mediante el índice de conversión del pienso.

10 **[0387]** Por «rendimiento mejorado del animal» se entiende que existe un incremento de la eficiencia del pienso, y/o un mayor aumento de peso y/o una reducción del índice de conversión del pienso y/o una mejora de la digestibilidad de nutrientes o energía en un pienso y/o mediante el aumento de la retención de nitrógeno y/o mediante una mejor respuesta inmune en el sujeto como resultado del uso de composición de aditivo para pienso de la presente invención en piensos en comparación con piensos que no comprenden dicha composición de aditivo para pienso.

[0388] Preferiblemente, por «rendimiento mejorado del animal» se entiende que existe un incremento de la eficiencia del pienso y/o un mayor aumento de peso y/o una reducción del índice de conversión del pienso.

20 **[0389]** Según se utiliza en el presente documento, el término «eficiencia del pienso» se refiere a la cantidad de aumento de peso por unidad de pienso cuando el animal es alimentado a voluntad o con una cantidad determinada de pienso durante un período de tiempo.

[0390] Por «incremento de la eficiencia del pienso» se entiende que el uso de una composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención en piensos da como resultado un mayor aumento de peso por unidad de ingesta de pienso en comparación con un animal alimentado sin que esté presente dicha composición de aditivo para pienso.

25 ÍNDICE DE CONVERSIÓN DEL PIENSO (FCR)

[0391] Según se utiliza en el presente documento, el término «índice de conversión del pienso» se refiere a la cantidad de pienso con la que se alimenta a un animal para incrementar el peso del animal en una cantidad determinada.

[0392] Un mejor índice de conversión del pienso implica un menor índice de conversión del pienso.

30 **[0393]** Por «menor índice de conversión del pienso» o «mejor índice de conversión del pienso» se entiende que el uso de una composición de aditivo para pienso en el pienso da como resultado una menor cantidad de pienso necesaria para alimentar a un animal con el fin de incrementar el peso del animal en una cantidad determinada en comparación con la cantidad de pienso necesaria para incrementar el peso del animal en la misma cantidad cuando el pienso no comprende dicha composición de aditivo para pienso.

35 DIGESTIBILIDAD DE NUTRIENTES

40 **[0394]** La digestibilidad de nutrientes, según se utiliza en el presente documento, significa la fracción de un nutriente que desaparece del tracto gastrointestinal o un segmento determinado del tracto gastrointestinal, p. ej., el intestino delgado. La digestibilidad de nutrientes se puede medir como la diferencia entre lo que se administra al sujeto y lo que aparece en las heces del sujeto, o entre lo que se administra al sujeto y lo que permanece en el contenido que está siendo digerido en un segmento determinado del tracto gastrointestinal, p. ej., el íleon.

45 **[0395]** La digestibilidad de nutrientes, según se utiliza en el presente documento, se puede medir mediante la diferencia entre la ingesta de un nutriente y el nutriente excretado por medio de la recolección total de excrementos durante un período de tiempo; o bien, con el uso de un marcador inerte que no es absorbido por el animal, y que permite al investigador calcular la cantidad de nutriente que ha desaparecido en la totalidad del tracto gastrointestinal o en un segmento del tracto gastrointestinal. Dicho marcador inerte puede ser dióxido de titanio, óxido de cromo o cenizas insolubles en ácido. La digestibilidad se puede expresar como un porcentaje del nutriente en el pienso, o como unidades de masa de nutriente digerible por unidades de masa de nutriente en el pienso.

50 **[0396]** La digestibilidad de nutrientes, según se utiliza en el presente documento, abarca digestibilidad de almidón, digestibilidad de grasa, digestibilidad de proteínas, y digestibilidad de aminoácidos.

55 **[0397]** Según se utiliza en el presente documento, la digestibilidad de energía se refiere a la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta de las heces o la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta del contenido restante que está siendo digerido en un segmento determinado del tracto gastrointestinal del animal, p. ej., el íleon. La energía metabolizable, según se utiliza en el presente documento, se refiere a la energía metabolizable aparente y significa la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta contenida en las heces, orina y productos gaseosos de la digestión. La digestibilidad de energía y la

energía metabolizable se pueden medir como la diferencia entre la ingesta de energía bruta y la energía bruta excretada en las heces o el contenido que está siendo digerido presente en un segmento determinado del tracto gastrointestinal utilizando los mismos métodos para medir la digestibilidad de nutrientes, con correcciones apropiadas en el caso de la excreción de nitrógeno para calcular la energía metabolizable del pienso.

5 COMBINACIÓN CON OTROS COMPONENTES

[0398] La enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta, de la presente invención se puede utilizar en combinación con otros componentes.

10 **[0399]** En una forma de realización, la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada), o un fragmento de esta, de la presente invención se puede utilizar en combinación con un probiótico o un microbio suministrado directamente en el alimento (DFM, por sus siglas en inglés), p. ej., una bacteria suministrada directamente en el alimento.

15 **[0400]** La combinación de la presente invención comprende la enzima que posee actividad xilanasa, p. ej., la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 parental o modificada) o un fragmento de esta, de la presente invención o una composición que comprende la xilanasa, p. ej., una composición de aditivo para pienso, y otro componente que resulta adecuado para el consumo humano o animal y que es capaz de ofrecer un beneficio médico o fisiológico al consumidor.

20 **[0401]** En una forma de realización, el «otro componente» puede ser una o más enzimas adicionales (p. ej., otras enzimas para piensos o enzimas para elaboración de cerveza o malteado, o enzimas de procesamiento de granos o enzimas de separación de gluten de trigo y almidón).

25 **[0402]** Las enzimas adicionales adecuadas para su uso en la presente invención pueden ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4); celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91), β -glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), celulasas (E.C. 3.2.1.74), liquenasas (E.C. 3.1.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), aciltransferasas lipídicas (clasificadas generalmente como E.C. 2.3.1.x), fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), fitasas (p. ej., 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), amilasas, alfa-amilasas (E.C. 3.2.1.1), otras xilanasas (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73), glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3), hemicelulasas, proteasas (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)), enzimas desramificantes, cutinasas, esterases y/o mananasas (p. ej., una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).

30 **[0403]** En una forma de realización (especialmente para aplicaciones de piensos), el otro componente puede ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una amilasa (incluyendo α -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas de formación de G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y γ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)); y/o una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una fitasa (p. ej., una 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8)).

[0404] En una forma de realización (especialmente para aplicaciones de piensos), el otro componente puede ser una combinación de una amilasa (p. ej., α -amilasas (E.C. 3.2.1.1)); y una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62)).

40 **[0405]** En una forma de realización (especialmente para aplicaciones de piensos), el otro componente puede ser una β -glucanasa, p. ej., una endo-1,3(4)- β -glucanasa (E.C. 3.2.1.6).

[0406] En una forma de realización (especialmente para aplicaciones de piensos), el otro componente puede ser una fitasa (p. ej., una 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8)).

[0407] En una forma de realización (especialmente para aplicaciones de piensos), el otro componente puede ser una mananasa (p. ej., una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).

45 **[0408]** En una forma de realización (especialmente para aplicaciones de piensos), el otro componente puede ser una lipasa (E.C. 3.1.1.3), una aciltransferasa lipídica (clasificada generalmente como E.C. 2.3.1.x), o una fosfolipasa (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), convenientemente una lipasa (E.C. 3.1.1.3).

50 **[0409]** En una forma de realización (especialmente para aplicaciones de piensos), el otro componente puede ser una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)).

[0410] En una forma de realización, el componente adicional puede ser un estabilizante o un emulsionante o un aglutinante o vehículo o un excipiente o un diluyente o un disgregante.

55 **[0411]** El término «estabilizante», según se utiliza en el presente documento, se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (p. ej., un producto de pienso) cambie a lo largo del tiempo.

[0412] El término «emulsionante», según se utiliza en el presente documento, se refiere a un ingrediente (p. ej., un ingrediente para pienso) que impide la separación de emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gota, contenida dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite en agua, donde la gota o fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua en aceite, donde el agua se convierte en la fase dispersa y la fase continua es aceite. Las espumas, que son gas en líquido, y las suspensiones, que son sólido en líquido, se pueden estabilizar también a través del uso de emulsionantes.

[0413] Según se utiliza en el presente documento, el término «aglutinante» se refiere a un ingrediente (p. ej., un ingrediente para pienso) que une el producto a través de una reacción física o química. Por ejemplo, durante la «gelificación», se absorbe agua, proporcionando un efecto ligante. No obstante, los aglutinantes pueden absorber otros líquidos, como aceites, manteniéndolos en el interior del producto. En el contexto de la presente invención, se utilizarían normalmente aglutinantes en productos sólidos o con bajo contenido de humedad; por ejemplo, productos de panadería: hojaldres, rosquillas, pan y otros. Entre los ejemplos de aglutinantes de granulación se incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.

[0414] Los «vehículos» hacen referencia a materiales adecuados para la administración de la enzima e incluyen cualquiera de dicho material conocido en la técnica como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, agente solubilizante, o similares, que no sea tóxico y que no interactúe con otros componentes de la composición de manera perjudicial.

[0415] La presente invención expone un método para preparar una composición (p. ej., una composición de aditivo para pienso) que comprende mezclar una enzima de la presente invención con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado de entre al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato de calcio), ciclodextrina, trigo o un componente del trigo, sacarosa, almidón, Na_2SO_4 , talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbato, glicerol, sacarosa, propilenglicol, 1,3-propanodiol, glucosa, parabenos, cloruro de sodio, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.

[0416] Entre los ejemplos de «excipientes» se incluye(n) uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio, glicina, almidón, azúcar de leche y polietilenglicoles con alto peso molecular.

[0417] Entre los ejemplos de «disgregantes» se incluye(n) uno o más de: almidón (preferiblemente almidón de maíz, de patata o de tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos.

[0418] Entre los ejemplos de «diluyentes» se incluye(n) uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

[0419] Los otros componentes se pueden utilizar de manera simultánea (p. ej., cuando están mezclados entre sí o incluso cuando se proporcionan por diversas vías) o de manera secuencial (p. ej., cuando se proporcionan por diversas vías) con respecto a la xilanasas de la presente invención.

[0420] Preferiblemente, cuando la composición de aditivo para pienso de la presente invención se mezcla con otro(s) componente(s), el DFM sigue siendo viable.

[0421] En una forma de realización, preferiblemente, la composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención no comprende cromo ni cromo orgánico.

En una forma de realización, preferiblemente, el aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención no contiene glucanasa.

[0422] En una forma de realización, preferiblemente, el aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención no contiene ácido sórbico.

AISLADO/A(S)

[0423] En un aspecto, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos, o ácido nucleico, o enzima de acuerdo con la presente invención se encuentra en una forma aislada. El término «aislado/a(s)» significa que la secuencia o enzima o ácido nucleico está al menos considerablemente libre de al menos un otro componente con el cual la secuencia, enzima o ácido nucleico se encuentra asociado de manera natural en la naturaleza y tal y como se encuentra en la naturaleza. La secuencia, enzima o ácido nucleico de la presente invención se puede proporcionar en una forma que está considerablemente libre de uno o más contaminantes con el cual se podría asociar, en caso contrario, la sustancia. Así, por ejemplo, podría estar considerablemente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

PURIFICADO/A(S)

[0424] En un aspecto, preferiblemente la secuencia, enzima o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se encuentra en una forma purificada. El término «purificado/a(s)» significa que el componente dado está presente en un nivel alto. Convenientemente, el componente es el componente predominante presente en una composición. Preferiblemente, está presente en un nivel de al menos aproximadamente un 90 %, o al menos

aproximadamente un 95 %, o al menos aproximadamente un 98 %, estando determinado dicho nivel en peso seco/peso seco con respecto a la composición total en cuestión.

SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

5 [0425] El alcance de la presente invención abarca secuencias de nucleótidos que codifican proteínas que presentan las propiedades específicas definidas en el presente documento.

10 [0426] El término «secuencia de nucleótidos», según se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos, y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de esta (tales como partes de la misma). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser bicatenaria o monocatenaria, tanto si representan la cadena codificante como la cadena no codificante.

[0427] El término «secuencia de nucleótidos», en relación con la presente invención, incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferiblemente, implica una secuencia de ADN, más preferiblemente de ADNc, que codifica la presente invención.

[0428] En una forma de realización, el término «secuencia de nucleótidos» significa ADNc.

15 [0429] En una forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos, cuando se relaciona con el alcance *per se* de la presente invención y cuando se encuentra abarcada por este, no incluye la secuencia de nucleótidos nativa de acuerdo con la presente invención cuando se encuentra en su entorno natural y cuando está enlazada a su(s) secuencia(s) asociada(s) de manera natural que también está(n) en su entorno natural. Para facilitar la referencia, se denominará esta forma de realización preferida la «secuencia de nucleótidos no nativa». En este sentido, el término «secuencia de nucleótidos nativa» significa una secuencia de nucleótidos completa que está en su entorno nativo y cuando está enlazada de manera operativa a un promotor completo con el que se asocia de manera natural, estando dicho promotor también en su entorno nativo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos abarcada en el alcance de la presente invención se puede aislar y/o purificar tras la expresión de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo. No obstante, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención se puede expresar mediante una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo, pero donde la secuencia de nucleótidos no está controlada por el promotor al que está asociado naturalmente en ese organismo.

30 [0430] Normalmente, la secuencia de nucleótidos abarcada por el alcance de la presente invención se prepara utilizando técnicas de ADN recombinante (esto es, ADN recombinante). Sin embargo, en una forma de realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos se podría sintetizar, total o parcialmente, utilizando métodos químicos conocidos en la técnica (véase Caruthers MH *et al.*, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T *et al.*, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

PREPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

35 [0431] Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que presenta las propiedades específicas definidas en el presente documento, o bien una proteína que resulta adecuada para la modificación, se puede identificar y/o aislar y/o purificar a partir de cualquier célula u organismo que produzca dicha proteína. En la técnica se conocen diversos métodos para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias de nucleótidos. A modo de ejemplo, se pueden utilizar técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia una vez se haya identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

40 [0432] A modo de ejemplo, se puede construir una genoteca de ADN genómico o de ADNc utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero procedente del organismo que produce la enzima. Si se conoce la secuencia de aminoácidos de la enzima, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos marcadas y utilizarse para identificar clones codificantes de enzimas de la genoteca genómica preparada a partir del organismo. Como alternativa, se podría utilizar una sonda de oligonucleótidos marcada que contenga secuencias homólogas a otro gen de enzima conocido para identificar clones codificantes de enzimas. En este último caso, se emplean condiciones de hibridación y de lavado menos exigentes.

50 [0433] De manera alternativa, los clones codificantes de enzimas se podrían identificar insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas a enzimas con la genoteca de ADN genómico resultante, y sembrando a continuación las bacterias transformadas en placas de agar que contengan un sustrato para enzima (esto es, arabinosilano), permitiendo así la identificación de clones que expresan la enzima.

55 [0434] En todavía otra alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente mediante métodos normalizados establecidos, p. ej., el método de la fosforamidita descrito en Beucage S.L. *et al.*, (1981) Tetrahedron Letters 22, p 1859-1869, o el método descrito en Matthes *et al.*, (1984) EMBO J. 3, p 801-805. En el método de la fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, p. ej., en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se reasocian, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

- 5 [0435] La secuencia de nucleótidos puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc, o de origen mixto genómico y de ADNc, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según proceda) conforme a técnicas convencionales. Cada fragmento ligado corresponde a diversas partes de la secuencia completa de nucleótidos. La secuencia de ADN se puede preparar también mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos, por ejemplo, según se describe en el documento US 4,683,202 o en Saiki R K *et al.* (Science (1988) 239, pp. 487-491).

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

- [0436] El alcance de la presente invención abarca además secuencias de aminoácidos de enzimas que presentan las propiedades específicas descritas en el presente documento.
- 10 [0437] Según se utiliza en el presente documento, el término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo del término «polipéptido» y/o del término «proteína». En algunos casos, el término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo del término «péptido». En algunos casos, el término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo del término «enzima».
- 15 [0438] La secuencia de aminoácidos se puede preparar/aislar de una fuente adecuada, o se puede realizar de manera sintética, o se puede preparar empleando técnicas de ADN recombinante.
- [0439] Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos, cuando se relaciona con el alcance *per se* de la presente invención y cuando se encuentra abarcada por este, no es una enzima nativa. En este sentido, el término «enzima nativa» implica una enzima completa que se encuentra en su entorno nativo y cuando ha sido expresada por su secuencia de nucleótidos nativa.

20 IDENTIDAD DE SECUENCIAS U HOMOLOGÍA DE SECUENCIAS

- [0440] La presente invención abarca además el uso de secuencias que presenten un grado de identidad de secuencias o de homología de secuencias con secuencia(s) de aminoácidos de un polipéptido que posea(n) las propiedades específicas definidas en el presente documento, o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifique dicho polipéptido (en adelante denominada(s) «secuencia(s) homóloga(s)»). En este caso, el término
- 25 «homólogo/a(s)» implica una entidad que presenta cierta homología con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencias de nucleótidos objeto. En este caso, el término «homología» se puede equiparar con «identidad».
- [0441] La secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos homóloga(s) debería(n) proporcionar y/o codificar un polipéptido que conserve la actividad funcional y/o mejore la actividad de la enzima.
- [0442] En este contexto, en algunas formas de realización, se toma una secuencia homóloga para incluir una
- 30 secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que puede ser al menos un 97,7 % idéntica, preferiblemente al menos un 98 o 99 % idéntica con respecto a la secuencia objeto.
- [0443] En algunas formas de realización, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que puede ser al menos un 85 % idéntica, preferiblemente al menos un 90 o 95 % idéntica a la secuencia objeto.
- 35 [0444] Normalmente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., que, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos objeto. A pesar de que la homología se puede considerar también por lo que respecta a la similitud (esto es, residuos de aminoácidos que presentan funciones/propiedades químicas similares), en el contexto de la presente invención, es preferible expresar la homología en función de la identidad de secuencias.
- [0445] En una forma de realización, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos
- 40 o secuencia de nucleótidos que presenta una o varias adiciones, deleciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia objeto.
- [0446] En el presente contexto, «la secuencia objeto» se refiere a la secuencia de nucleótidos o secuencia polipeptídica/de aminoácidos de acuerdo con la invención.
- [0447] Preferiblemente, el % de identidad de secuencias con respecto a la secuencia polipeptídica se determina
- 45 utilizando la SEQ ID N.º 1 como la secuencia objeto en un alineamiento de secuencias. En una forma de realización, la secuencia polipeptídica objeto se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 26, SEQ ID N.º 27, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 28, SEQ ID N.º 29, o SEQ ID N.º 5.
- [0448] Preferiblemente, el % de identidad de secuencias con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina utilizando la SEQ ID N.º 2 como la secuencia objeto en el alineamiento de secuencias. En una forma
- 50 de realización, la secuencia objeto para secuencias de nucleótidos se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID N.º 2, SEQ ID N.º 24, SEQ ID N.º 25, SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 30, SEQ ID N.º 31, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 32 o SEQ ID N.º 33.
- [0449] Un «ácido nucleico parental» o «aminoácido parental» se refiere, respectivamente, a una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que codifica el polipéptido parental.

[0450] En una forma de realización, la presente invención se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en el presente documento o una proteína derivada de esta proteína (parental) mediante sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, como 10 o más de 10 aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que posee la actividad de la proteína parental.

[0451] De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos se determina en al menos 20 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 30 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 40 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 50 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 60 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 200 aminoácidos contiguos.

[0452] En una forma de realización, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico (o gen) que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en el presente documento o que codifica una proteína derivada de esta proteína (parental) mediante sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, como 10 o más de 10 aminoácidos, en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que posee la actividad de la proteína parental.

[0453] En el presente contexto, en una forma de realización, se toma una secuencia homóloga o secuencia foránea para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos un 97,7 % idéntica, preferiblemente al menos un 98 o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia objeto).

[0454] En otra forma de realización, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos un 85 % idéntica, preferiblemente al menos un 90 o 95 % idéntica, con respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia objeto).

[0455] Normalmente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., que la secuencia objeto. A pesar de que la homología se puede considerar también por lo que respecta a la similitud (esto es, residuos de aminoácidos que presentan propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención, se prefiere expresar la homología en función de la identidad de secuencias.

[0456] Las comparaciones de homología se pueden llevar a cabo visualmente o, más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología o el % de identidad entre dos o más secuencias.

[0457] El % de homología o % de identidad se puede calcular en secuencias contiguas, esto es, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina alineamiento «sin hueco». Normalmente, dichos alineamientos sin hueco se llevan a cabo únicamente en un número relativamente reducido de residuos.

[0458] Aunque se trata de un método muy simple y coherente, no tiene en cuenta, por ejemplo, que, en un par de secuencias que de lo contrario serían idénticas, una inserción o delección provocará que los siguientes residuos de aminoácidos queden fuera del alineamiento, dando posiblemente como resultado, por tanto, una gran reducción del % de homología o del % de identidad cuando se realiza un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología total. Esto se logra insertando «huecos» en el alineamiento de secuencias para tratar de maximizar la homología local.

[0459] No obstante, estos métodos más complejos asignan «penalizaciones por hueco» a cada hueco que aparezca en el alineamiento, de tal manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con los mínimos huecos posibles (que refleje una mayor relación entre las dos secuencias comparadas) logrará una puntuación más alta que uno con muchos huecos. Se utilizan habitualmente «costes por hueco afín» que aplican un coste relativamente elevado por la existencia de un hueco, y una penalización menor por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación por huecos más utilizado habitualmente. Naturalmente, las penalizaciones por hueco altas producirán alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, es preferible emplear los valores por defecto al utilizar dicho *software* para comparaciones de secuencias.

[0460] Por consiguiente, el cálculo del % de homología o % de identidad máximo precisa, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Entre los ejemplos de *software* que pueden realizar comparaciones de secuencias se incluye, aunque sin carácter limitativo, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4.^a Ed. - Capítulo 18), BLAST 2 (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov),

FASTA (Altschul *et al.*, 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para búsquedas sin conexión y con conexión a Internet (véase Ausubel *et al.*, 1999, páginas 7-58 a 7-60), como, por ejemplo, en la herramienta de búsqueda GenomeQuest (www.genomequest.com).

- 5 [0461] Aunque el % de homología o % de identidad final se puede medir por lo que respecta a la identidad, el propio proceso de alineamiento no se basa normalmente en una comparación de pares de todo o nada. En cambio, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud en escala que asigna puntuaciones para cada comparación de pares en función de la similitud química o de la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada habitualmente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas Vector NTI utilizan generalmente los valores públicos por defecto, o bien una tabla comparativa de símbolos personalizada en caso de que se facilite (para más detalles, véase el manual de usuario). Para algunas aplicaciones, es preferible utilizar los valores por defecto para el paquete Vector NTI.

- 10 [0462] Como alternativa, se puede calcular el porcentaje de homologías utilizando la característica de alineamiento múltiple en Vector NTI (Invitrogen Corp.), en función de un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

- 15 [0463] Una vez ha producido el *software* un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencias. Normalmente, el *software* lleva a cabo este paso como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

[0464] En caso de que las penalizaciones por hueco se utilicen al determinar la identidad de secuencias, entonces se utilizan, preferiblemente, los siguientes parámetros para el alineamiento de pares:

PARA BLAST	
HUECO ABIERTO	9
EXTENSIÓN DE HUECO	2

20

PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA
Matriz de pesos	IUB	Gonnet 250
APERTURA DE HUECO	15	10
EXTENSIÓN DE HUECO	6,66	0,1

[0465] En una forma de realización, se puede utilizar CLUSTAL con la penalización por hueco y la extensión de hueco configuradas según se ha definido anteriormente.

- 25 [0466] De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos o secuencia proteica se determina en al menos 20 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 30 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 40 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 50 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 60 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 100 nucleótidos/aminoácidos contiguos.

- 30 [0467] De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina en al menos 100 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 200 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 300 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 400 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 500 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 600 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 700 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 800 nucleótidos contiguos.

[0468] De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar en la secuencia completa expuesta en el presente documento.

- 35 [0469] Convenientemente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar en la secuencia completa expuesta en el presente documento como la secuencia madura, p. ej., SEQ ID N.º 2 o SEQ ID N.º 24 o SEQ ID N.º 25 o SEQ ID N.º 4, SEQ ID N.º 30, SEQ ID N.º 31, SEQ ID N.º 6, SEQ ID N.º 32 o SEQ ID N.º 33. De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar en la secuencia completa expuesta en el presente documento como SEQ ID N.º 2.
- 40

[0470] De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia proteica (de aminoácidos) se determina al menos en 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 200 aminoácidos contiguos, preferiblemente en al menos 300 aminoácidos contiguos.

5 **[0471]** Convenientemente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteica se puede determinar en la secuencia completa expuesta en el presente documento.

[0472] Convenientemente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteica se puede determinar en la secuencia completa expuesta en el presente documento como la secuencia madura, p. ej., SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 26, SEQ ID N.º 27, SEQ ID N.º 3, SEQ ID N.º 28, SEQ ID N.º 29 o SEQ ID N.º 5. De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteica se puede
10 determinar en la secuencia completa expuesta en el presente documento como SEQ ID N.º 1.

[0473] En el presente contexto, el término «secuencia problema» se refiere a una secuencia homóloga o a una secuencia foránea, que se alinea con una secuencia objeto con el fin de observar si se encuadra en el alcance de la presente invención. Por consiguiente, dicha secuencia problema puede ser, por ejemplo, una secuencia del estado de la técnica o una secuencia de terceros.

15 **[0474]** En una forma de realización preferida, las secuencias se alinean mediante un programa de alineamiento global y se calcula la identidad de secuencias identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la longitud de la secuencia objeto.

[0475] En una forma de realización, el grado de identidad de secuencias entre una secuencia problema y una secuencia objeto se determina 1) alineando las dos secuencias mediante cualquier programa de alineamiento
20 adecuado empleando la matriz de puntuación por defecto y la penalización por hueco por defecto, 2) identificando el número de coincidencias exactas, donde una coincidencia exacta ocurre cuando el programa de alineamiento ha identificado un aminoácido o nucleótido idéntico en las dos secuencias alineadas en una posición determinada en el alineamiento y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la secuencia objeto.

25 **[0476]** En todavía otra forma de realización preferida, el programa de alineamiento global se selecciona del grupo que consiste en CLUSTAL y BLAST (preferiblemente BLAST), y la identidad de secuencias se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la longitud de la secuencia objeto.

[0477] Las secuencias pueden presentar también delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de
30 aminoácidos que dan como resultado una sustancia equivalente desde el punto de vista funcional. Se pueden realizar sustituciones deliberadas de aminoácidos en función de la similitud en cuanto a la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o carácter anfipático de los residuos. Por ejemplo, entre los aminoácidos con carga negativa se incluyen el ácido aspártico y el ácido glutámico; entre los aminoácidos con carga negativa se incluyen la lisina y la arginina; y entre los aminoácidos con grupos principales polares sin carga
35 que poseen unos valores de hidrofilicidad similares se incluyen la leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

[0478] Se pueden realizar sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos que están en el mismo bloque de la segunda columna, y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna, se pueden sustituir entre sí:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - sin carga	C S T M
		N Q
	Polares - con carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

[0479] La presente invención abarca también la sustitución de homólogos (tanto sustitución como reemplazo se utilizan en el presente documento para hacer referencia al intercambio de un residuo de aminoácido existente por un residuo alternativo) que pueda tener lugar, esto es, sustitución de igual a igual, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. Se puede producir también sustitución de no homólogos, esto es, de un tipo de residuo por otro o, de forma alternativa, implicando la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (denominado en lo sucesivo Z), ácido diaminobutírico ornitina (denominado en lo sucesivo B), norleucina ornitina (denominado en lo sucesivo O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

[0480] Se pueden realizar también sustituciones por aminoácidos no naturales, entre los que se incluyen: aminoácidos alfa* y alfa-disustituidos*, aminoácidos N-alquilo*, ácido láctico*, derivados haluros de aminoácidos naturales, tales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alilglicina*, β-alanina*, ácido L-α-aminobutírico*, ácido L-γ-aminobutírico*, ácido L-α-aminoisobutírico*, ácido L-ε-aminocaproico#, ácido 7-aminoheptanoico*, L-metionina sulfona#, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metílicos de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metilo)*, L-Phe (4-isopropilo)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo). La notación * se ha utilizado a efectos de la descripción anterior (en relación con la sustitución de homólogos o de no homólogos) para indicar el carácter hidrofóbico del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar el carácter hidrófilo del derivado, #* indica características anfipáticas.

[0481] Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se puedan insertar entre cualquier grupo de dos residuos de aminoácidos de la secuencia, incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o de β-alanina. Los expertos en la materia comprenderán otra forma de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptóide. Para evitar cualquier duda, «la forma peptóide» se utiliza para hacer referencia a las variantes de residuos de aminoácidos en las que el grupo sustituyente α-carbono se encuentra en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar de en el α-carbono. En la técnica se conocen procesos para preparar péptidos en forma peptóide, por ejemplo, Simon RJ *et al.*, PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

[0482] En una forma de realización, la xilanasasa para su uso en la presente invención puede comprender una secuencia polipeptídica que se muestra como SEQ ID N.º 17, SEQ ID N.º 18, SEQ ID N.º 19, SEQ ID N.º 20, o SEQ ID N.º 21 con una sustitución conservadora de al menos uno de los aminoácidos.

[0483] Convenientemente, puede haber al menos 2 sustituciones conservadoras, tales como al menos 3 o al menos 4 o al menos 5.

[0484] Convenientemente, puede haber menos de 15 sustituciones conservadoras, tales como menos de 12, menos de 10 o menos de 8 o menos de 5.

[0485] Las secuencias de nucleótidos para su uso en la presente invención pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen numerosos tipos distintos de modificación de oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. A efectos de la presente invención, se ha de entender que las secuencias de nucleótidos descritas en el presente documento se pueden modificar mediante cualquier método disponible en la técnica. Se pueden llevar a cabo tales modificaciones con el fin de mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias de nucleótidos de la presente invención.

[0486] La presente invención abarca también el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias que se muestran en el presente documento, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces se puede utilizar esa secuencia como una sonda para identificar secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

[0487] Se pueden obtener de diversos modos polinucleótidos que no sean 100 % homólogos respecto a las secuencias de la presente invención, pero que se encuentren dentro del alcance de la invención. Se pueden obtener otras variantes de las secuencias descritas en el presente documento, por ejemplo, sondando genotecas de ADN realizadas a partir de una gama de individuos, por ejemplo, individuos de distintas poblaciones. Asimismo, se pueden obtener otros homólogos, y, por lo general, dichos homólogos y fragmentos de los mismos serán capaces de hibridarse de manera selectiva con las secuencias mostradas en el listado de secuencias del presente documento. Dichas secuencias se pueden obtener sondando genotecas de ADNc o genotecas de ADN genómico elaboradas a partir de otras especies de animales, y sondando dichas genotecas con sondas que comprenden la totalidad o parte de cualquiera de las secuencias de los listados de secuencias adjuntos con condiciones de exigencia media a alta. Se aplican consideraciones similares a la obtención de homólogos de la especie y variantes alélicas de las secuencias polipeptídicas o de nucleótidos de la invención.

[0488] Las variantes y homólogos de la cepa/especie se pueden obtener también empleando PCR degenerada, que utilizará cebadores diseñados para secuencias objetivo en las variantes y homólogos que codifiquen secuencias de aminoácidos conservadas en las secuencias de la presente invención. Se pueden predecir las secuencias conservadas, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos procedentes de diversas

variantes/homólogos. Se pueden llevar a cabo los alineamientos de secuencias utilizando programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp se utiliza ampliamente.

5 **[0489]** Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán con condiciones de exigencia inferiores a las utilizadas para secuencias de clonación con cebadores únicos de secuencias frente a secuencias conocidas.

10 **[0490]** De forma alternativa, dichos polinucleótidos se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida de secuencias caracterizadas. Esto puede resultar útil, por ejemplo, cuando se necesiten cambios silenciosos en la secuencia del codón para optimizar las preferencias del codón por una célula hospedadora concreta en la que se expresen las secuencias de polinucleótidos. Pueden resultar convenientes otros cambios de secuencias con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

15 **[0491]** Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención se pueden utilizar para producir un cebador, p. ej., un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, p. ej., marcada con una marca reveladora a través de medios convencionales utilizando marcas radiactivas o no radiactivas, o se pueden clonar los polinucleótidos en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos contendrán al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud, y también se encuentran abarcados por el término polinucleótidos de la invención según se ha utilizado en el presente documento.

20 **[0492]** Los polinucleótidos, tales como polinucleótidos y sondas de ADN de acuerdo con la invención, se pueden producir de manera recombinante, sintética, o a través de cualquier medio disponible para los expertos en la materia. Se pueden clonar también mediante técnicas convencionales.

[0493] Por lo general, los cebadores se producirán a través de medios sintéticos, que implican una fabricación paso a paso de la secuencia deseada de ácido nucleico, un nucleótido cada vez. Existen técnicas para lograrlo empleando técnicas automatizadas fácilmente disponibles en la técnica.

25 **[0494]** Por lo general, se producirán polinucleótidos más largos utilizando medios recombinantes, por ejemplo, utilizando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden estar diseñados para contener sitios de reconocimiento adecuados de enzimas de restricción, de tal forma que el ADN amplificado se puede clonar en un vector de clonación adecuado.

NUMERACIÓN DE AMINOÁCIDOS

30 **[0495]** En la presente invención, se puede emplear una numeración específica de posiciones de residuos de aminoácidos en las xilanasas utilizadas en la presente invención. Mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de una muestra de xilanasas con la xilanasas de la presente invención (especialmente, la SEQ ID N.º 1), es posible asignar un número a una posición de residuo de aminoácido en dicha muestra de xilanasas que corresponde a la posición de residuo de aminoácido o a la numeración de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N.º 1 de la presente invención.

HIBRIDACIÓN

[0496] La presente invención abarca también secuencias que sean complementarias a las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención o secuencias que sean capaces de hibridarse con las secuencias de la presente invención o con secuencias que sean complementarias a estas.

40 **[0497]** El término «hibridación», según se utiliza en el presente documento, incluirá «el proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria mediante el apareamiento de bases», así como el proceso de amplificación llevado a cabo en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

45 **[0498]** La presente invención abarca también el uso de secuencias de nucleótidos que sean capaces de hibridarse con las secuencias que son complementarias a las secuencias que se exponen en el presente documento, o cualquier fragmento o derivado de las mismas.

[0499] El término «variante» abarca también secuencias que sean complementarias a secuencias que sean capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos que se muestran en el presente documento.

50 **[0500]** Preferiblemente, el término «variante» abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones exigentes (p. ej., 50 °C y SSC 0,2x {SSC 1x = 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de Na₃, pH 7.0}) con las secuencias de nucleótidos que se muestran en el presente documento.

[0501] Más preferiblemente, el término «variante» abarca secuencias que sean complementarias a secuencias que sean capaces de hibridarse en condiciones de alta exigencia (p. ej., 65 °C y SSC 0,1x {SSC 1x = 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de Na₃, pH 7.0}) con las secuencias de nucleótidos que se muestran en el presente documento.

[0502] La presente invención se refiere también a secuencias de nucleótidos que se pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias a las que se muestran en el presente documento).

- 5 [0503] La presente invención se refiere también a secuencias de nucleótidos que son complementarias a secuencias que se pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias a las que se muestran en el presente documento).

[0504] Preferiblemente, la hibridación se analiza en la totalidad de las secuencias dadas a conocer en el presente documento.

EXPRESIÓN DE ENZIMAS

- 10 [0505] La secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención se puede incorporar en un vector recombinante replicable. El vector se puede utilizar para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de proteína/enzima, en una célula hospedadora compatible o a partir de una célula hospedadora compatible.

[0506] Se puede controlar la expresión utilizando secuencias de control, p. ej., secuencias reguladoras.

- 15 [0507] La proteína producida por una célula hospedadora recombinante mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos se puede secretar o puede estar contenida intracelularmente en función de la secuencia y/o del vector utilizado. Las secuencias de codificación pueden estar diseñadas con secuencias señal que dirijan la secreción de las secuencias que codifican la sustancia a través de una membrana celular procariota o eucariota en particular.

20 CÉLULAS HOSPEDADORAS PARA ENZIMAS XILANASAS PARENTALES Y MODIFICADAS Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

- [0508] Tras haber clonado las secuencias de ADN que codifican las enzimas xilanasas parentales o modificadas en constructos de ADN, se utiliza el ADN para transformar microorganismos. El microorganismo que se va a transformar con el fin de expresar una xilanasas modificada de acuerdo con la presente invención se puede escoger de entre una amplia variedad de células hospedadoras. Las secciones que se exponen a continuación se proporcionan como ejemplos de células/microorganismos hospedadores, y no pretenden limitar el alcance de las células hospedadoras que se pueden emplear en aspectos prácticos de la presente invención.

(i) Hongos filamentosos

- 30 [0509] Aspectos de la presente invención incluyen hongos filamentosos que hayan sido modificados, seleccionados y cultivados de manera efectiva para dar como resultado una producción o expresión de xilanasas modificada deseada en relación con los correspondientes hongos filamentosos parentales no transformados.

- [0510] Entre los ejemplos de especies de hongos filamentosos parentales que se pueden tratar y/o modificar para la expresión deseada de xilanasas se incluyen, aunque sin carácter limitativo, *Trichoderma*, *Penicillium* sp., *Humicola* sp., incluido *Humicola insolens*; *Aspergillus* sp., incluido *Aspergillus niger*, *Chrysosporium* sp., *Myceliophthora* sp., *Fusarium* sp., *Hypocrea* sp., y *Emericella* sp.

- 40 [0511] Las células que expresan una xilanasas modificada deseada se cultivan en condiciones empleadas normalmente para cultivar la línea fúngica parental. Por lo general, se cultivan células en un medio convencional que contiene sales fisiológicas y nutrientes, como los que se describen en Pourquie, J. *et al.*, Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, eds. Aubert, J. P. *et al.*, Academic Press, pp. 71-86, 1988 e Ilmen, M. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. 63:1298-1306, 1997. En la técnica se conocen condiciones convencionales de cultivo, p. ej., se incuban cultivos a 28 °C en cultivos con agitador o fermentadores hasta alcanzar niveles deseados de expresión deseable de xilanasas modificadas.

- 45 [0512] Se pueden encontrar condiciones de cultivo para un hongo filamentoso determinado, por ejemplo, en la literatura científica y/o a través de la fuente de los hongos, tal como la American Type Culture Collection (ATCC). Tras haber establecido el crecimiento fúngico, las células se exponen a condiciones efectivas para generar o permitir la expresión de una xilanasas deseada modificada.

[0513] En los casos en los que una secuencia deseada que codifica una xilanasas parental o modificada está controlada por un promotor inducible, el agente inductor, por ejemplo, un azúcar, sal metálica o antibiótico, se añade al medio en una concentración efectiva para inducir la expresión de la xilanasas modificada deseada.

- 50 [0514] En una forma de realización, la cepa es una cepa de *Aspergillus niger*, que es una cepa útil para obtener proteína sobreexpresada. Por ejemplo, se sabe que dgr246 de *A. niger* var *awamori* secreta cantidades elevadas de celulasas secretadas (Goedegebuur *et al.*, Curr. Genet (2002) 41: 89-98). Se conocen otras cepas de *Aspergillus niger* var *awamori*, tales como GCDAP3, GCDAP4 y GAP3-4 (Ward *et al.*, 1993, Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:738-743).

- 55 [0515] En otra forma de realización, la cepa es una cepa de *Trichoderma reesei*, que es una cepa útil para obtener proteína sobreexpresada. Por ejemplo, se sabe que RL-P37, descrita en Sheir-Neiss, *et al.*, Appl.

Microbiol. Biotechnol. 20:46-53 (1984), secreta cantidades elevadas de enzimas celulasas. Entre los equivalentes funcionales de RL-P37 se incluyen la cepa RUT-C30 (ATCC n.º 56765) y la cepa QM9414 (ATCC n.º 26921) de *Trichoderma reesei*. Se contempla que estas cepas también resultarían útiles en la sobreexpresión de la variante GA.

- 5 **[0516]** Cuando se desea obtener una xilanasa parental o modificada en ausencia de actividad xilanasa nativa potencialmente perjudicial, resulta útil obtener una cepa de célula hospedadora en la que se hayan delecionado uno o más genes de glucoamilasa antes de la introducción de un constructo de ADN o plásmido que contenga el fragmento de ADN que codifica la variante deseada de GA. Dichas cepas se pueden preparar de cualquier modo conveniente, por ejemplo, mediante el método dado a conocer en la patente estadounidense n.º 5,246,853 y en el documento WO 92/06209. Al expresar una xilanasa deseada modificada en un microorganismo hospedador al que le falta(n) uno o más genes de xilanasa (p. ej., el gen de xilanasa endógena de una célula hospedadora), se simplifican, cuando así se desee, los procedimientos de identificación y posterior purificación.

- 15 **[0517]** La delección de genes se puede lograr insertando una forma del gen que se desea delecionar o alterar en un plásmido mediante métodos conocidos en la técnica. El plásmido de delección se corta a continuación en un sitio o sitios de enzimas de restricción adecuado(s), en el interior de la región codificadora del gen deseado, y la secuencia codificadora del gen o parte de la misma se sustituye por un marcador seleccionable. Las secuencias de ADN flanqueantes del locus del gen que se ha de delecionar o alterar (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 kb a aproximadamente 2,0 kb) pueden permanecer en cualquier lado del gen marcador seleccionable. Un plásmido de delección adecuado tendrá generalmente sitios únicos de enzimas de restricción presentes en el mismo para permitir que se elimine el fragmento que contiene el gen delecionado, incluyendo las secuencias de ADN flanqueantes, y el gen marcador seleccionable como una única pieza lineal.

- 20 **[0518]** En ciertas formas de realización, puede haber presente más de una copia de ADN que codifique una xilanasa modificada o parental deseable en una cepa hospedadora para facilitar la sobreexpresión de la xilanasa modificada. Por ejemplo, una célula hospedadora puede presentar múltiples copias de una xilanasa parental o modificada deseable integradas en el genoma o, de manera alternativa, puede incluir un vector plasmídico que sea capaz de replicarse de manera autónoma en el organismo hospedador.

(ii) Levadura

- 30 **[0519]** La presente invención contempla también la utilización de levadura como célula hospedadora para la producción deseada de enzima xilanasa. Algunos otros genes que codifican enzimas hidrolíticas se han expresado en diversas cepas de la levadura *S. cerevisiae*. Estos incluyen secuencias que codifican dos endoglucanasas (Penttilä *et al.*, 1987), dos celobiohidrolasas (Penttilä *et al.*, 1988) y una beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei* (Cummings y Fowler, 1996), una xilanasa de *Aureobasidium pullulans* (Li y Ljungdahl, 1996), una alfa-amilasa de trigo (Rothstein *et al.*, 1987), etc.

(iii) Otros

- 35 **[0520]** Se contempla además que, en algunas formas de realización, se pueden emplear sistemas de expresión en células hospedadoras que no sean células de hongos filamentosos ni células de levaduras, incluidos sistemas de expresión de células vegetales, de algas, de insectos o células bacterianas. Algunas de las células hospedadoras bacterianas pueden ser, por ejemplo, una que sea también un etanologen, tal como un *Zymomonas mobilis* modificado, que no sea capaz únicamente de expresar la(s) enzima(s)/variante(s) de interés, sino que también sea capaz de metabolizar ciertos azúcares monoméricos y otros azúcares fermentables, convirtiéndolos en etanol. La selección de una célula hospedadora se puede determinar según los deseos del usuario de la xilanasa modificada descrita en el presente documento y, por lo tanto, no se pretende ninguna limitación en ese sentido.

45 UTILIDAD DE ENZIMAS XILANASAS MODIFICADAS PARA LA RECUPERACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE FERMENTACIÓN

- [0521]** Según se ha descrito con detalle anteriormente, las xilanasas son enzimas comerciales muy importantes que se utilizan en una amplia variedad de aplicaciones que implican procesos de fermentación que generan subproductos valiosos, p. ej., aceite. Algunos procesos de fermentación están diseñados para producir edulcorantes de maíz de alta fructosa, que comprenden más del 50 % del mercado de edulcorantes en Estados Unidos, así como en procesos para la producción directa de glucosa. En general, las glucoamilasas se pueden utilizar, y se utilizan normalmente, con alfa-amilasas en procesos de hidrolización de almidón para hidrolizar almidón a dextrinas y a continuación a glucosa.

- 50 **[0522]** Dada la importancia comercial de los subproductos de fermentación, se puede apreciar que los ácidos nucleicos deseados que codifican xilanasa parental o modificada, los polipéptidos deseados de xilanasa parental o modificada, y composiciones que comprenden los mismos, se pueden utilizar en una amplia variedad de aplicaciones. La propiedad o propiedades mejorada(s) de la xilanasa parental o modificada descrita en el presente documento se puede(n) explotar de diversos modos. Por ejemplo, la xilanasa parental o modificada con rendimiento mejorado en la recuperación de aceite, con condiciones de estrés térmico o con reducción de viscosidad, se puede utilizar para incrementar la recuperación de subproductos (p. ej., recuperación de aceite).

Se pueden explotar otras propiedades mejoradas de polipéptidos de xilanasa parental o modificada, incluyendo variantes de GA que presentan pH óptimos alterados, una mayor estabilidad o actividad en un pH específico, una mayor actividad específica para un sustrato, y/o un nivel elevado de expresión en una célula hospedadora de interés.

- 5 [0523] Un material a base de cereales, p. ej. almidón, que procese una enzima adicional que contenga una xilanasa parental o modificada que se desee, según se describe en el presente documento, se puede utilizar en la producción de etanol. El etanol procedente de este proceso se puede utilizar además como un mejorador de octanaje o directamente como combustible en lugar de gasolina, lo cual resulta ventajoso, puesto que el etanol como fuente de combustible es más ecológico que los productos derivados del petróleo. Se sabe que el uso de etanol mejorará la calidad del aire y posiblemente reducirá los niveles locales de ozono y esmog. Además, la utilización de etanol en lugar de gasolina puede ser de importancia estratégica en la amortiguación del impacto de los cambios repentinos en la energía no renovable y los suministros petroquímicos.

- 10 [0524] La sacarificación y fermentación por separado es un proceso mediante el cual el almidón presente en una materia prima, p. ej., maíz, se convierte en glucosa y, posteriormente, un etanologen (p. ej., una cepa de levadura) convierte la glucosa en etanol. La sacarificación y fermentación simultáneas (SFS) es un proceso por el cual el almidón presente en una materia prima se convierte en glucosa y, al mismo tiempo y en el mismo reactor, un etanologen convierte la glucosa en etanol. Así, la xilanasa parental o modificada de la invención se puede utilizar para mejorar la recuperación de subproductos de fermentación, p. ej., la recuperación de aceite, en ambos de estos procesos que implican la degradación de materia prima que contiene almidón para generar etanol.

[0525] En algunas formas de realización, una xilanasa parental o modificada según se describe en el presente documento se expresa en un etanologen, a través del cual la actividad enzimática de la xilanasa parental o modificada expresada por el etanologen puede aumentar las cantidades de recuperación de subproductos. Esto se puede lograr con o sin la adición de xilanasa modificada exógena.

- 25 [0526] La xilanasa modificada descrita en el presente documento se puede utilizar para generar células hospedadoras para producir productos bioquímicos de interés. De este modo, aspectos de la presente descripción incluyen métodos para producir una sustancia bioquímica mediante la obtención de una célula hospedadora que expresa una xilanasa modificada según se describe en el presente documento y mediante el cultivo de la célula hospedadora en condiciones para producir la sustancia bioquímica de interés. La célula hospedadora puede incluir modificaciones adicionales para favorecer la producción de la sustancia bioquímica que se desee, p. ej., para expresar genes homólogos o heterólogos, variantes adicionales de genes, y/o para suprimir o inactivar de otra forma la expresión de uno o más genes endógenos. Entre las sustancias bioquímicas de interés se incluyen, aunque sin carácter limitativo, alcoholes (etanol, metanol, butanol, etc.) y otros compuestos orgánicos, incluyendo moléculas orgánicas volátiles (p. ej., isopreno).

- 35 [0527] Es preciso señalar que se pueden utilizar xilanasas parentales o modificadas que faciliten la recuperación mejorada de subproductos, por ejemplo, en zonas donde sea necesario neutralizar la actividad enzimática a temperaturas inferiores, de tal forma que otras enzimas que pueden estar presentes permanezcan intactas. Además, las enzimas se pueden utilizar en la conversión limitada de celulósicas, por ejemplo, en combinación con glucoamilasa al controlar el grado de cristalización o de longitud de la cadena celulósica. Tras alcanzar el grado de conversión deseado, la temperatura de sacarificación puede aumentar por encima de la temperatura de supervivencia de la xilanasa (y glucoamilasa) modificada desestabilizada.

VECTOR DE EXPRESIÓN

[0528] El término «vector de expresión» hace referencia a un constructo capaz de llevar a cabo expresión *in vivo* o *in vitro*.

- 45 [0529] Preferiblemente, el vector de expresión está incorporado en el genoma de un organismo hospedador adecuado. El término «incorporado/a(s)» abarca preferiblemente la incorporación estable en el genoma.

[0530] La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede estar presente en un vector en el que la secuencia de nucleótidos esté ligada operativamente a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos mediante un organismo hospedador adecuado.

- 50 [0531] Los vectores para su uso en la presente invención se pueden transformar en una célula hospedadora adecuada según se describe más adelante para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

[0532] La elección del vector, p. ej., un plásmido, cósmido, o vector fago, dependerá a menudo de la célula hospedadora en la que se pretenda introducir.

- 55 [0533] Los vectores para su uso en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tales como un gen que confiera resistencia a antibióticos, p. ej., resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Como alternativa, la selección se puede lograr mediante cotransformación (según se describe en el documento WO91/17243).

[0534] Se pueden utilizar vectores *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN, o se pueden utilizar para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.

5 [0535] Por lo tanto, en otra forma de realización, la invención expone un método para realizar secuencias de nucleótidos de la presente invención introduciendo una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible, y cultivando la célula hospedadora en condiciones que propicien la replicación del vector.

[0536] El vector puede comprender, además, una secuencia de nucleótidos que permita que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión. Entre los ejemplos de tales secuencias se encuentran los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

10 SECUENCIAS REGULADORAS

[0537] En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención está ligada operativamente a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, mediante la célula hospedadora elegida. A modo de ejemplo, la presente invención abarca un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención ligada operativamente a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

[0538] El término «ligado/a(s) operativamente» se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en su modo previsto. Una secuencia reguladora «ligada operativamente» a una secuencia de codificación está ligada de tal modo que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

20 [0539] El término «secuencias reguladoras» incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

[0540] El término «promotor» se utiliza en el sentido normal de la técnica, p. ej., un sitio de unión de la ARN polimerasa.

25 [0541] Se puede conseguir una mejor expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas p. ej., regiones promotora, conductora de la secreción y terminadora.

[0542] Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención está ligada operativamente a al menos un promotor.

30 [0543] Se pueden utilizar incluso otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido de la presente invención.

[0544] En la técnica, se conocen ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en un hospedador bacteriano, fúngico o de levadura.

35 [0545] Asimismo, el promotor puede incluir características para asegurar o para incrementar la expresión en un hospedador adecuado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas, tales como una caja de Pribnow o una caja TATA.

CONSTRUCTOS

[0546] El término «constructo», que es sinónimo de términos como «conjugado», «casete» e «híbrido», incluye una secuencia de nucleótidos para su uso de acuerdo con la presente invención fijada directa o indirectamente a un promotor.

40 [0547] Un ejemplo de una fijación indirecta es la disposición de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia intrónica, como el intrón Sh1 o el intrón ADH, entre el promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Se puede aplicar lo mismo al término «fusionado/a(s)» en relación con la presente invención, que incluye fijación directa o indirecta. En algunos casos, los términos no abarcan la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína asociada normalmente al promotor del gen de tipo natural y
45 cuando se encuentran ambos en su entorno natural.

[0548] El constructo puede incluso contener o expresar un marcador, lo cual permite la selección del constructo genético.

[0549] Para algunas aplicaciones, el constructo de la presente invención comprende preferiblemente al menos la secuencia de nucleótidos de la presente invención ligada operativamente a un promotor.

50 CÉLULAS HOSPEDADORAS

[0550] El término «célula hospedadora», en relación con la presente invención, incluye cualquier célula que comprenda la secuencia de nucleótidos o bien un vector de expresión según se ha descrito anteriormente y que se utiliza en la producción recombinante de una proteína que presenta las propiedades específicas definidas en el presente documento.

[0551] En una forma de realización, el organismo es un hospedador de expresión.

[0552] Por lo tanto, otra forma de realización de la presente invención proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos que expresa la proteína de la presente invención. Se elegirán las células para que sean compatibles con dicho vector y estas pueden ser, por ejemplo, células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas o de levaduras.

[0553] Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son especies de bacterias grampositivas o gramnegativas.

[0554] En una forma de realización, las xilanasas dadas a conocer en el presente documento se expresan en el hospedador de expresión *Trichoderma reesei*.

[0555] En algunas formas de realización, el hospedador de expresión para las xilanasas dadas a conocer en el presente documento puede ser uno o más de los siguientes hospedadores fúngicos de expresión: *Fusarium* spp. (tal como *Fusarium oxysporum*); *Aspergillus* spp. (tal como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, o *A. awamori*) o bien *Trichoderma* spp. (tal como *T. reesei*).

[0556] En algunas formas de realización, el hospedador de expresión puede ser uno o más de los siguientes hospedadores bacterianos de expresión: *Streptomyces* spp. o *Bacillus* spp. (p. ej., *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*).

[0557] El uso de células hospedadoras adecuadas, tales como células hospedadoras fúngicas y de levaduras, puede contemplar modificaciones postraduccionales (p. ej., miristoilación, glucosilación, truncamiento, lipidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina), según sea necesario, para conferir una actividad biológica óptima en productos de expresión recombinante de la presente invención.

ORGANISMO

[0558] El término «organismo», en relación con la presente invención, incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la presente invención y/o productos obtenidos a partir de este, y/o donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención cuando se encuentra presente en el organismo.

[0559] En una forma de realización, el organismo es un hospedador de expresión.

[0560] Entre los organismos adecuados se puede incluir un procariota, hongo, levadura o una planta.

[0561] El término «organismo transgénico», en relación con la presente invención, incluye cualquier organismo que comprenda la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la presente invención y/o los productos obtenidos a partir de este, y/o donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención en el organismo. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos está incorporada en el genoma del organismo.

[0562] El término «organismo transgénico» no abarca secuencias nativas de codificación de nucleótidos en su entorno natural cuando están controladas por su promotor nativo, que también se encuentra en su entorno natural.

[0563] Por consiguiente, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende cualquiera, o combinaciones, de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la presente invención, constructos de acuerdo con la presente invención, vectores de acuerdo con la presente invención, plásmidos de acuerdo con la presente invención, células de acuerdo con la presente invención, tejidos de acuerdo con la presente invención, o los productos de los mismos.

[0564] Por ejemplo, el organismo transgénico puede comprender también la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la presente invención controlado por un promotor heterólogo.

TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS/ORGANISMO HOSPEDADOR/A(S)

[0565] Según se ha indicado anteriormente, el organismo hospedador puede ser un organismo procariota o eucariota. Entre los ejemplos de hospedadores procariotas adecuados se incluyen *E. coli*, *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp., p. ej., *Bacillus subtilis*.

[0566] En la técnica, se han documentado ideas sobre la transformación de hospedadores procariotas; véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.^a edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se utiliza un hospedador procariota, entonces puede ser necesario modificar de manera adecuada la secuencia de nucleótidos antes de la transformación; por ejemplo, mediante la supresión de intrones.

[0567] Las células de hongos filamentosos se pueden transformar utilizando diversos métodos conocidos en la técnica, como un proceso que implique la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos y, a

continuación, la regeneración de la pared celular de un modo conocido. El uso de *Aspergillus* como microorganismo hospedador se describe en el documento EP 0 238 023.

[0568] La transformación de procariotas, hongos y levaduras resulta conocida, por lo general, para un experto en la materia.

- 5 **[0569]** Un organismo hospedador puede ser un hongo, tal como un moho. Entre los ejemplos de dichos hospedadores adecuados se incluye cualquier miembro perteneciente a los géneros *Trichoderma* (p. ej., *T. reesei*), *Thermomyces*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora* y similares.

[0570] En una forma de realización, el organismo hospedador puede ser un hongo. En una forma de realización preferida, el organismo hospedador pertenece al género *Trichoderma*, p. ej., *T. reesei*.

10 CULTIVO Y PRODUCCIÓN

[0571] Las células hospedadoras transformadas con la secuencia de nucleótidos de la presente invención se pueden cultivar en condiciones propicias para la producción del polipéptido codificado y que faciliten la recuperación del polipéptido a partir de las células y/o del medio de cultivo.

- 15 **[0572]** El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de la célula hospedadora en cuestión y para la obtención de la expresión del polipéptido.

[0573] La proteína producida por una célula recombinante se puede mostrar en la superficie de la célula.

[0574] La proteína se puede secretar desde las células hospedadoras y puede recuperarse cómodamente del medio de cultivo utilizando procedimientos conocidos.

SECRECIÓN

- 20 **[0575]** A menudo, es deseable que se secrete la proteína desde el hospedador de expresión al medio de cultivo desde donde se puede recuperar más fácilmente la proteína. De acuerdo con la presente invención, la secuencia conductora de la secreción se puede seleccionar en función del hospedador de expresión deseado. Se pueden utilizar también secuencias señal híbridas en el contexto de la presente invención.

APLICACIÓN A GRAN ESCALA

- 25 **[0576]** En una forma de realización preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se utiliza para aplicaciones a gran escala.

[0577] Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 1 g por litro a aproximadamente 100 g por litro del volumen total de cultivo celular tras haber realizado el cultivo del organismo hospedador.

- 30 **[0578]** Convenientemente, la secuencia de aminoácidos se puede producir en una cantidad de 30 g por litro a aproximadamente 90 g por litro del volumen total de cultivo celular tras haber realizado el cultivo del organismo hospedador.

TÉCNICAS METODOLÓGICAS GENERALES DE ADN RECOMBINANTE

- 35 **[0579]** La presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que forman parte de las capacidades de un experto en la materia. Tales técnicas se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a Edición, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley e Hijos, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley e Hijos; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.
- 40

[0580] A continuación se describirá la invención, únicamente a título ilustrativo, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

45 EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Materiales y métodos

Construcción de plásmido y genoteca

- 50 **[0581]** Una secuencia de ADN que contenía la región codificante de xilanas 4 (la familia GH10) del hongo filamentoso *Fusarium verticilloides*, FveXyn4, se amplificó a partir del ADN genómico con los cebadores específicos del gen ampliados con los sitios attB1 y attB2 para permitir que la recombinación de PB de Gateway® se clone en el vector pDonor221 (Invitrogen, EE. UU.). El plásmido pEntry-FveXyn4, según se

muestra en la figura 20, lo utilizaron los proveedores BaseClear (Países Bajos) y Geneart GmbH (Alemania) como molde para la construcción de genotecas combinatorias.

[0582] Las variantes de FveXyn4 se generaron como genotecas combinatorias o bien mediante la introducción de mutaciones específicas, y se diseñaron para incluir distintos números y combinaciones de las mutaciones indicadas en la Tabla 1. Las variantes A, B, C, D y E se incluyeron en estas variantes. Las variantes combinatorias se generaron mediante la técnica de recombinación de Gateway® (Invitrogen, EE. UU.) con el vector de destino pTTTpyr2 (figura 21). Los plásmidos de expresión resultantes pTTTpyr2-FveXyn4_VAR que expresaban Xyn4 con distintas mutaciones se amplificaron en la cepa DH5a de *Escherichia coli*, se purificaron, se secuenciaron, se distribuyeron individualmente en microplacas (MTP) de 96 pocillos y se utilizaron para la transformación fúngica según se describe posteriormente. El vector de expresión contiene las regiones promotora y terminadora de *cbhl* de *T. reesei* que permiten una clara expresión inducible de un gen de interés, confiriendo los marcadores selectivos *amdS* de *Aspergillus nidulans* y *pyr2* de *T. reesei* un cultivo de transformantes en medio mínimo con acetamida en ausencia de uridina. Los plásmidos se mantienen de manera autónoma en la célula fúngica debido a las regiones teloméricas derivadas de *T. reesei*. El uso de plásmidos replicativos da como resultado un aumento de las frecuencias de transformación y elude los problemas observados derivados de la expresión dependiente del locus con transformación fúngica integradora. Se introdujeron mutaciones específicas en la secuencia genómica de la xilanasa Xyn4 de *Fusarium verticilloides* a través de una síntesis genética *de novo* (GeneArt GmbH, Alemania). A continuación, el proveedor clonó variantes sintéticas en el vector de destino pTTT-pyr2 por medio de una técnica de recombinación de Gateway (Invitrogen, Carlsbad, California, EE. UU.).

Cepas fúngicas, medios de cultivo y transformación

[0583] Los plásmidos de expresión (5-10 µl) se transformaron utilizando un método PEG-protoplasto en una cepa de *T. reesei* con las celulasas principales y la xilanasa 2 suprimidas ($\Delta cbh1 \Delta cbh2 \Delta egl1 \Delta egl2 \Delta egl3 \Delta egl4 \Delta egl5 \Delta egl6 \Delta bgl1 \Delta man1 \Delta xyn2 \Delta prdiv: iRNAxyn1 xyn3: amdS pyr2$). La regulación por disminución adicional de las muestras control de xilanasa 1 y 3 endógena se logró además introduciendo un casete de interferencia de ARNi en el genoma de la cepa huésped con el objetivo de detener la expresión de *xyn1* y *xyn3* de manera simultánea. Todas las transformaciones de alto rendimiento se llevaron a cabo robóticamente en un formato de MTP de 24 pocillos utilizando robots Biomek (Beckman Coulter, EE. UU.). Se recibieron, a través de los proveedores, plásmidos con variantes en MTP de 96 pocillos distribuidos conforme a una disposición predeterminada. Las mezclas de transformación que contenían aproximadamente 1 µg de ADN y 5×10^6 protoplastos en un volumen total de 50 µl se trataron con 200 µl de solución de PEG al 25 %, se diluyeron con 1 volumen de 1,2 M de sorbitol/10 mM de Tris, pH 7.5 / 10 mM de solución de $CaCl_2$, se reorganizaron robóticamente en MTP de 24 pocillos y se mezclaron con 1 ml de medio mínimo de agarosa al 3 % que contenía 1 M de sorbitol y 10 mM de NH_4Cl . Tras el cultivo de transformantes, se agruparon esporas de cada pocillo y se reconfiguraron en nuevas MTP de 24 pocillos con MM que contenía acetamida para la presión selectiva adicional. Una vez formadas las esporas, se recogieron esporas y se utilizaron para la inoculación de cultivos líquidos en un formato de MTP de 24 pocillos o bien en frascos de agitación en el siguiente medio de producción: 37 g/l de glucosa, 1 g/l de soforosa, 9 g/l de casaminoácidos, 10 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 5 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 33 g/l de 1,4-Piperazinabis(ácido propanosulfónico), pH 5.5, 2,5 ml/l de oligoelementos 400X de *T. reesei* (175 g/l de ácido cítrico, 200 g/l de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 16 g/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,2 g/l de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,4 g/l de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,8 g/l de ácido bórico). Se añadió 1 ml de medio de producción para producir variantes en MTP de 24 pocillos. En el caso de los frascos de agitación, se incrementaron los volúmenes.

[0584] Las placas se cultivaron durante 6 días a 28 °C y con un 80 % de humedad con agitación a 200 rpm. Se recogieron sobrenadantes de cultivo mediante filtración al vacío y se utilizaron para analizar su rendimiento, así como su nivel de expresión.

[0585] Para la producción a mayor escala, se llevó a cabo la fermentación en un reactor agitado continuo de 6 litros esterilizable en el autoclave. Los frascos de agitación se inocularon con esporas y se incubaron con agitación durante 3 días a 28 °C en el siguiente medio de frasco de agitación: 5 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 4,5 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 14,4 g/l de ácido cítrico $\times 1H_2O$, 1 g/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 27,5 g/l de glucosa, 1 gota de agente antiespumante (EROL DF 6000K). El pH se ajustó con NaOH (2 M) hasta 5.5 y los medios se esterilizaron 20 minutos en el autoclave a 122 °C. Tras enfriarse, se añadieron 2,5 ml/l de oligoelementos 400X de *T. reesei* (175 g/l de ácido cítrico, 200 g/l de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 16 g/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,2 g/l de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,4 g/l 0,8 g/l de ácido bórico). Se utilizaron células del frasco de agitación para inocular el biorreactor que contenía el siguiente medio del biorreactor: 4,7 g/l de KH_2PO_4 , 1 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4,3 g/l de $(NH_4)_2SO_4$, 45 g/l de glucosa, 0,7 g/l de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,3 g/l de agente antiespumante (EROL DF 6000K), 2,5 ml/l de oligoelementos 400X de *T. reesei* (175 g/l de ácido cítrico, 200 g/l de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 16 g/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 3,2 g/l de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 1,4 g/l 0,8 g/l de ácido bórico). La temperatura se controló a 34 °C; el pH se controló continuamente añadiendo hidróxido de amonio al 20 %. El oxígeno disuelto se controló a un mínimo de 40 % de saturación modificando la velocidad de agitación. Se midió el contenido liberado de dióxido de carbono y de oxígeno. Cuando se agotó la glucosa inicial, comenzó un suministro constante de una glucosa/soforosa. Al mismo tiempo que se redujo la temperatura y se controló a 28 °C, el pH se incrementó y se controló a 4.5. Se

puso fin a la fermentación pasadas 140 horas. El caldo se extrajo del tanque, y se obtuvieron las células mediante filtración. Tras la separación celular, el líquido filtrado se concentró mediante ultrafiltración. Por último, el concentrado se filtró de forma estéril y se utilizó para estudios de estabilidad de granulación.

Muestras enzimáticas

- 5 [0586] Se midió la actividad xilanasa de sobrenadantes de cultivo procedentes de MTP utilizando el método para la medición de la actividad xilanasa, según se describe más adelante. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron 20 y 130 veces en 25 mM de acetato de sodio, 250 mM de NaCl, pH 4.0. Se mezclaron 25 µl de muestra enzimática diluida con 150 µl de sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5.0 y se incubaron a 30 °C durante 15 min con agitación. Tras la incubación, se mezclaron 45,4 µl de muestra de reacción con 135 µl de solución funcional
- 10 PAHBAH y se incubaron a 95 °C durante 5 min antes de enfriarse a 20 °C durante 10 s. Se transfirieron 100 µl de muestra a un pocillo de placa de microtitulación, y la placa se leyó a 410 nm.

- [0587] La actividad se calculó como la media de tres replicaciones con un blanco sustraído que incluían 25 mM de acetato de sodio, 250 mM de NaCl, pH 4.0 en lugar de enzima. La concentración de proteínas en las muestras se calculó en función de una curva estándar de FveXyn4 purificada. Todas las muestras se diluyeron a
- 15 50 ppm en 25 mM de acetato de sodio, 250 mM de NaCl, pH 4.0. Estas muestras normalizadas se utilizaron como solución madre enzimática en ensayos descritos más adelante.

[0588] La concentración de proteínas en la solución madre enzimática se midió mediante HPLC según se describe más adelante.

- [0589] La actividad xilanasa de concentrados filtrados de forma estéril procedentes de la producción a gran escala se midió mediante el siguiente ensayo de actividad. Se pesaron 0,5 g de cada concentrado en 100 ml de matraces aforados y, a continuación, se llenaron hasta su capacidad con tampón Mcllvaine, pH 5.0. Las muestras se diluyeron a aprox. 6 XU/ml utilizando tampón Mcllvaine, pH 5.0. Se añadieron 100 µl de muestra diluida en 1 ml de tampón Mcllvaine, pH 5.0, en tubos de ensayo y se equilibraron a 50 °C durante 2 min. Se
- 20 añadió un comprimido de Xylazyme (100 mg) para iniciar la reacción, y se incubaron las muestras a 40 °C durante 10 min antes de detener la reacción añadiendo 10 ml de Tris al 2 %, pH 12.0. La solución se mezcló utilizando un agitador vorticial, se dejó reposar durante 5 min y se mezcló de nuevo antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado. La actividad xilanasa se cuantificó en relación con un estándar enzimático (xilanasa de Danisco, disponible a través de Danisco Animal Nutrition).

- 30 [0590] La enzima de referencia Econase® XT está disponible comercialmente, y se extrajo de muestras comerciales formuladas secas. El componente de xilanasa de muestras comerciales formuladas secas de Econase® XT se extrajo en una suspensión al 33 % (peso/peso) utilizando tampón Mcllvaine, pH 5.0. El extracto se aclaró utilizando centrifugación (3000 RCF durante 10 min) y se filtró utilizando un filtro de jeringa PALL Acrodisc PF (0,8/0,2 µm de membrana Supor), y posteriormente se calentó 20 min a 70 °C. Tras la extracción de precipitación mediante centrifugación (38 724 RCF durante 15 min), el tampón se sustituyó al pasar a través de
- 35 una columna Sephadex G25 (PD10 de Pharmacia) equilibrada con 20 mM de citrato de Na, 20 mM de NaCl, pH 3.4. La purificación del componente de xilanasa se llevó a cabo utilizando resina Source 15S, seguida por elución con un gradiente lineal creciente de sal (NaCl en 20 mM de tampón citrato de Na, pH 3.4).

- [0591] La Econase XT® es una endo-1,4-β-xilanasa (EC 3.2.1.8) producida por la cepa RF5427 (CBS 114044) de *Trichoderma reesei*, disponible a través de ABVista.
- 40

[0592] La concentración de proteínas se determinó midiendo la absorción a 280 nm. Los coeficientes de extinción eran estimaciones de las secuencias de aminoácidos. Para la Econase XT, se calculó que la absorción a 280 nm de 1 mg/ml era 2,84 AU.

Determinación de proteínas mediante HPLC

- 45 [0593] Se utilizó una MTP (n.º de parte Agilent 5042-1385) que contenía 100 µl de solución madre enzimática con una concentración aproximada de 50 ppm por pocillo para el método de determinación de proteínas con cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés). Se utilizó una HPLC de Agilent 1260 o 1290 (Hewlett Packard) equipada con una columna Acuity UPLC BEH 125 SEC (Waters) para separar los contaminantes restantes. La muestra se eluyó de la columna utilizando 25 mM de tampón fosfato de sodio, pH
- 50 6.8, que contenía 250 mM de cloruro de sodio. La absorbancia se midió a 220 nm, se integró empleando el *software* ChemStation (Agilent Technologies) y la concentración de proteínas de las muestras se determinó en función de una curva estándar de proteína/enzima FveXyn4-v1 purificada que presentaba la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 1.

Medición de actividad xilanasa

- 55 [0594] La actividad xilanasa de las muestras enzimáticas se determinó midiendo la cantidad de azúcares reductores liberados del WE-AX (arabinoxilano extraíble en agua) de trigo hidrolizado. La cantidad de azúcares reductores se midió mediante el método PAHBAH. En pocas palabras, en condiciones de calor y alcalinas, los

grupos terminales reductores reaccionan con la PAHBAH sin color (hidracida del ácido 4-Para-hidroxibenzoico), mediante lo cual se oxida la PAHBAH y se mide la absorbancia a 410 nm (Lever, 1972).

- 5 **[0595]** Se preparó sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5.0, humedeciendo 0,25 g de arabinoxilano de trigo soluble (p. ej., Megazyme, viscosidad elevada ~43 cSt, P-WAXYH) con 2,5 ml de etanol al 96 %, antes de añadir 50 ml de 0,1 M de acetato de sodio, pH 5.0. La determinación de la actividad estándar se llevó a cabo a pH 5.0. Para la medición en otros valores de pH, los 50 ml de 0,1 M de acetato de sodio, pH 5.0, se sustituyeron con el tampón indicado. La solución se calentó con agitación hasta ebullición, y se enfrió con agitación hasta la temperatura ambiente.

- 10 **[0596]** La solución funcional PAHBAH se preparó mezclando solución madre PAHBAH al 5 % (4-hidroxibenzohidrazida, p. ej., Sigma-Aldrich H9882) en 0,5 M de HCl con 0,5 M de NaOH en una proporción 1:4 (v/v). La solución se preparó en el día del análisis, y se protegió de la luz.

- 15 **[0597]** Las muestras enzimáticas se diluyeron en el tampón indicado hasta una concentración de 1 ppm antes del análisis. Se mezclaron 25 µl de muestra enzimática diluida con 150 µl de sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5.0, y se incubaron a 30 °C durante 15 min con agitación. Tras la incubación, se mezclaron 45,4 µl de muestra de reacción con 135 µl de solución funcional PAHBAH y se incubaron a 95 °C durante 5 min antes de enfriarse a 20 °C durante 10 s. Se transfirieron 100 µl de muestra a un pocillo de placa de microtitulación, y la placa se leyó a 410 nm.

[0598] La actividad se calculó como la media de tres replicaciones con un blanco sustraído que incluían tampón de dilución apropiado en lugar de enzima.

20 **Ensayo para la medición de termoestabilidad**

- 25 **[0599]** Los perfiles de desnaturalización térmica de las variantes de FveXyn4 se midieron diluyendo y preincubando las muestras enzimáticas en 25 mM de tampón MES (0,00125 % de Tween 80 - 25 mM de tampón MES, pH 6.0, 0,00125 % (V:V) de Tween 80), pH 6.0, durante 10 minutos a diversas temperaturas (63, 65,5, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6 y 85 °C, respectivamente) y midiendo posteriormente la actividad residual por medio del método de actividad xilanasa descrito anteriormente. La actividad medida sin preincubación se configuró al 100 %, y se calculó la actividad residual de cada variante a cada temperatura relación con esta. El valor de T_m se calcula a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual.

Perfil de pH

- 30 **[0600]** El perfil de pH de las variantes de FveXyn4 se estudió midiendo la actividad en pH 4.0, 5.0 y 6.0. La actividad se midió fundamentalmente conforme a lo descrito en el método de actividad xilanasa descrito anteriormente. Las muestras enzimáticas se diluyeron en 0,1 M de acetato de Na, pH 4.0, 0,1 M de acetato de Na, pH 5.0, 0,1 % de BSA (p. ej., Sigma A7906), o tampón Mcllvaine, pH 6.0, para la actividad en pH 4.0, 5.0 o 6.0, respectivamente, antes del análisis. Se preparó sustrato WE-AX al 0,5 % en pH 4.0 y 6.0 conforme a lo descrito para el sustrato WE-AX al 0,5 %, pH 5.0, aunque se sustituyó 0,1 M de acetato de sodio, pH 5.0, por 0,1 M de acetato de Na, pH 4.0, o tampón Mcllvaine, pH 6.0, respectivamente.

Solubilización de pentosanos (solubilización de AXinsol)

- 40 **[0601]** El sustrato utilizado para medir la solubilización de pentosanos mediante variantes de FveXyn4 era DDGS de maíz. Se transfirieron 100 mg de cDDGS con un tamaño de partículas de < 212 µm a un tubo Eppendorf de 2 ml, y se registró el peso exacto. Se añadieron 750 µl de tampón de incubación (200 mM de HEPES, 100 mM de NaCl, 2 mM de CaCl₂, pH 6.0) y 900 µl de cloranfenicol (40 µg/ml en tampón de incubación). Se añadió un incremento de las dosis enzimáticas para conformar un volumen total de 1,8 ml.

- 45 **[0602]** Cada muestra se analizó en dobletes paralelamente a una muestra de control (sin enzima). Las muestras se incubaron a 40 °C con agitación. Tras 18 horas de incubación, se filtró el sobrenadante utilizando placas filtrantes de 96 pocillos (Pall Corporation, placa filtrante AcroPrep 96, cristal de 1,0 µm, NTRL, pocillo de 1 ml). Tras la filtración, las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el análisis de la cantidad total de azúcares C5, arabinosa y xilosa.

Cuantificación de azúcares C5 (pentosanos)

- 50 **[0603]** La cantidad total de pentosas incorporadas a la solución se midió utilizando el método de Rouau y Surget (1994) con un aparato de inyección de flujo continuo. Los sobrenadantes se trataron con ácido para hidrolizar polisacáridos en monoazúcares. Se añadió floroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno) para que reaccione con monopentosas y monohexosas, lo cual forma un complejo coloreado.

- 55 **[0604]** Mediante la medición de la diferencia de absorbancia a 550 nm comparada con 510 nm, se calculó la cantidad de pentosas presentes en la solución utilizando una curva estándar. Al contrario de lo que sucede en el complejo pentosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo hexosa-floroglucinol es constante en estas longitudes de onda. Se añadió glucosa a la solución de floroglucinol para crear una señal de glucosa constante y

para asegurar además que no existen interferencias de azúcares hexosas. La concentración de pentosas en las muestras se determinó utilizando una curva estándar de xilosa.

Modelo de ensayo animal *in vitro* de reducción de viscosidad

5 [0605] La reducción de viscosidad en el trigo se determinó utilizando una versión modificada del procedimiento descrito en Bedford y Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). Se mezclaron 3,6 ml de solución de pepsina (2000 U/ml en 0,1 N de HCl) con 2,4 g de trigo antes de la adición de la cantidad indicada de xilanasa (variantes de FveXyn4), y a continuación se incubó durante 45 min a 40 °C. Posteriormente, se mezclaron 1,2 ml de solución de pancreatina (8 mg/ml en 1 M de MES, pH 6.8) en la suspensión, dando como resultado un pH final de 6.0. Se dejó incubar la muestra durante 60 min a 40 °C, mezclando tras 30 y 60 min. A continuación, la muestra se colocó sobre hielo durante 5 min para detener la reacción, y se centrifugó 10 min a 3320 RCF, y posteriormente se filtró a través de un filtro de 0,45 µm para obtener un sobrenadante claro. La viscosidad de la muestra se midió a continuación a 20 °C utilizando un viscosímetro digital Brookfield (modelo DV-1+, Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, Massachusetts 02172, EE. UU.) provisto de un cono CPE-40 y una placa. Cada dato es la media de tres repeticiones.

15 Estabilidad de granulación

[0606] Los ensayos de granulación se realizaron a escala completa en el Instituto Tecnológico, Kolding (Dinamarca). Cada concentrado de xilanasa filtrado de forma estéril se formuló sobre trigo y se mezcló en una mezcla de pienso de maíz y soja (61,1 % de maíz, 31,52 % de soja Hipro 48, 4,00 % de aceite de soja, 0,40 % de bicarbonato de sodio, 0,25 % de vitaminas/minerales Leghennen, 0,20 % de DL-metionina, 1,46 % de fosfato de dicalcio, 1,16 % de caliza). Se preparó una premezcla mezclando las variantes de xilanasa formuladas sobre trigo en 10 kg de mezcla de pienso de maíz y soja, y se mezclaron durante 10 min. La premezcla se añadió a continuación en 120 kg de pienso, y se mezclaron durante 10 min antes del acondicionamiento. El pienso se acondicionó durante 30 s a 90 y 95 °C antes de la granulación. La papilla y los gránulos de pienso resultantes se trituraron utilizando un molino de laboratorio Perten (es importante que todas las muestras se trituren igual), y antes se analizó la actividad xilanasa en las muestras conforme al método de extracción o bien de suspensión descrito a continuación utilizando como sustrato arabinoxilano de trigo entrecruzado con azurina (p. ej., comprimidos de Xylazyme, Megazyme, Irlanda).

[0607] Método de extracción: se mezclaron 5,0 g de muestra molida con 50 ml de tampón Mcllvaine, pH 5.0, y se agitaron en un agitador magnético durante 10 min. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio y se diluyó 3-6 veces en 50 ml de tampón Mcllvaine, pH 5.0. Se mezclaron 100 µl de extracto diluido con 400 µl de tampón Mcllvaine, pH 5.0, y se equilibraron a 50 °C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (60 mg) para iniciar la reacción, y se incubaron las muestras a 50 °C durante 60 min antes de detener la reacción añadiendo 5 ml de Tris al 2 %, pH 12.0. La solución se mezcló utilizando agitador vorticial, se dejó reposar durante 5 min y se mezcló de nuevo antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se midió a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado.

[0608] La actividad xilanasa se cuantificó utilizando una curva estándar de xilanasa preparada para cada una de las variantes de xilanasa sobre papilla de blanco (sin enzimas) y pienso a 90 °C. La respectiva xilanasa formulada en trigo se extrajo durante 10 min en tampón Mcllvaine, pH 5.0, para obtener una concentración de 160 XU/ml. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio y, a continuación, se añadieron 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 µl de extracto a 5,0 g de muestras de papilla molida de blanco y pienso a 90 °C. La actividad xilanasa en estas muestras estándar se midió según lo descrito en el método de extracción expuesto anteriormente. Cada curva estándar se preparó una vez.

[0609] Método de suspensión: se mezcló 1,0 g de muestra molida con 50 ml de tampón Mcllvaine, pH 5.0, y se agitó en un agitador magnético en un baño de agua a 50 °C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (100 mg) para iniciar la reacción, y las muestras se incubaron con agitación a 50 °C durante 20 min (30 min para SV107). Tras la incubación, las muestras se filtraron a través de un filtro de fibra de vidrio, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado.

[0610] La actividad xilanasa se cuantificó utilizando una curva estándar de xilanasa preparada para cada una de las variantes de xilanasa sobre pienso en papilla de blanco (sin enzimas). La respectiva xilanasa formulada en trigo se extrajo durante 10 min en tampón Mcllvaine, pH 5.0, para obtener una concentración de 30 XU/ml. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio y, a continuación, se añadieron 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 µl en 1,0 g de muestras de pienso molido en papilla de blanco. La actividad xilanasa en estas muestras estándar se midió según lo descrito en el método de suspensión expuesto anteriormente. La curva estándar se preparó una vez.

55 [0611] La recuperación medida en pienso en papilla se configuró al 100 %, y la actividad residual de pienso a 90 y 95 °C se calculó en relación con esta.

Resultados y discusión

[0612] Tras una importante iniciativa, se identificaron cinco variantes de la xilanasa FveXyn4 estructural.

[0613] Las cinco variantes son, todas, mucho más termoestables que la molécula de referencia/parental, FveXyn4, según se muestra en la figura 11.

- 5 **[0614]** Una posterior caracterización de la variante en cuanto a las propiedades bioquímicas y de rendimiento importantes para una xilanasa que se fuera a utilizar, por ejemplo, en aplicaciones de piensos, identificó estas variantes como unas que eran termoestables y, además, presentaban un buen rendimiento/actividad bioquímica.

Tabla 1. Resumen de mutaciones en las cinco variantes de FveXyn4

Variantes	Mutaciones
A	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_K79Y_S89G_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S193_Y_A217Q_G219P_T298Y
B	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S193_Y_A217Q_G219P_T298Y
C	N7D_N25P_T33V_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
D	N7D_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
E	N7D_N25P_T33V_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y

La numeración se basa en la secuencia madura de FveXyn4. SEQ ID N.º 1.

[0615] La figura 11 muestra el valor de T_m de las 5 variantes A, B, C, D y E en comparación con FveXyn4. El valor de T_m se mide como la temperatura a la que se obtiene el 50 % de actividad residual tras 10 min de incubación.

[0616] La figura 12 muestra el perfil de pH de las cinco variantes medido con pH 4.0, 5.0 y 6.0, y todos los datos son relativos al tipo natural con pH 5.0. La totalidad de las cinco variantes presentan un perfil de pH que es ideal para su uso, por ejemplo, en aplicaciones para piensos.

[0617] Las figuras 13a y 13b muestran curvas de respuesta a la dosis en cuanto a la solubilización de pentosanos de DDGS de maíz y salvado de trigo, respectivamente, por las cinco variantes. La totalidad de las cinco variantes muestran una elevada capacidad para solubilizar arabinoxilano (pentosano) tanto de DDGS como de salvado de trigo, y todas al mismo nivel que la molécula de tipo natural. La totalidad de las cinco variantes resultan muy adecuadas para su uso, por ejemplo, en pienso para animales.

[0618] La figura 14 muestra la reducción de viscosidad en el «Modelo de ensayo animal *in vitro* de reducción de viscosidad» dado a conocer en el Ejemplo 1. La totalidad de las cinco variantes muestran una alta capacidad para reducir la viscosidad, y todas al mismo nivel que la molécula de tipo natural, y eran mucho mejores que la Econase XT de referencia.

[0619] La figura 15 muestra la recuperación de xilanasa en el pienso tras la granulación a 90 y 95 °C. La totalidad de las cinco variantes muestran una alta recuperación de xilanasa tras la granulación, y significativamente mayor que el tipo natural.

EJEMPLO 2**Clonación de la xilanasa estructural (parental) de *Fusarium verticillioides* (FveXyn4)**

[0620] El ADN genómico aislado de una cepa de *Fusarium verticillioides* se utilizó para amplificar un gen de xilanasa. La secuencia del gen clonado, denominado gen *FveXyn4*, se representa en la SEQ ID N.º 2. La proteína madura codificada por el gen *FveXyn4* se representa en la SEQ ID N.º 1. El producto proteico del gen *FveXyn4* pertenece a la familia glicosil hidrolasa 10 (GH10) en función de la búsqueda en PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

EJEMPLO 3**Expresión de la proteína estructural (parental) *FveXyn4***

[0621] El gen *FveXyn4* se amplificó a partir de ADN genómico de *Fusarium verticillioides* utilizando los siguientes cebadores: Cebador 1 5'-caccATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTA-3' (SEQ ID N.º 22) y Cebador 2 5'-TTTTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAGC-3' (SEQ ID N.º 23). El producto de PCR se clonó en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen K2400) para generar el plásmido pEntry de *FveXyn4*. El plásmido de expresión pZZH254 se obtuvo mediante reacción de clonación de Gateway entre el plásmido pEntry de *FveXyn4* y el vector de expresión pTrex3gM (descrito en el documento US 2011/0136197 A1) utilizando el kit enzimático LR Clonase® II de Gateway® (Invitrogen 11791). En la figura 16 se proporciona un mapa del plásmido pZZH254. La secuencia del gen *FveXyn4* se confirmó mediante secuenciación de ADN (SEQ ID N.º 2). El plásmido pZZH254 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* con un quad suprimido (como se describe en WO 05/001036) utilizando el método biolístico (Te'o VS *et al.*, J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002).

[0622] Tras la confirmación de la secuencia, los protoplastos de una cepa de *T. reesei* con un quad suprimido (como se describe en el documento WO 05/001036) se transformaron con el plásmido de expresión pZZH254 utilizando el método de protoplasto PEG (Penttilä *et al.*, Gene, 61:155-164, 1987). Para la preparación de protoplastos, se cultivaron esporas durante aproximadamente 10 horas a 24 °C en medio mínimo MM de *Trichoderma* (20 g/l de glucosa, 15 g/l de KH₂PO₄, pH 4.5, 5 g/l de (NH₄)₂SO₄, 0,6 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0,6 g/l de CaCl₂·2H₂O, 1 ml de solución de oligoelementos 1000X de *T. reesei* (175 g/l de ácido cítrico anhidro, 200 g/l de FeSO₄·7H₂O, 16 g/l de ZnSO₄·7H₂O, 3,2 g/l de CuSO₄, 1,4 g/l y 0,8 g/l de ácido bórico). Las esporas que germinaron se recogieron mediante centrifugación y se trataron con 30 mg/ml de solución Vinoflow FCE (Novozymes, AG Suiza) durante de 7 horas a toda la noche a 30 °C y a 100 rpm para lisar las paredes celulares fúngicas. Los protoplastos se lavaron en 0,1 M de tampón Tris HCl (pH 7) que contenían 0,6 M de sorbitol y se volvieron a suspender en 10 mM de tampón Tris HCl (pH 7.5) que contenían 1,2 M de sorbitol y 10 mM de cloruro de calcio. Para la transformación de PEG, se trató aproximadamente 1 µg de ADN y 1-5 x 10⁷ protoplastos en un volumen total de 200 µl con 2 ml de solución PEG al 25 %, se diluyeron con 2 volúmenes de 1,2 M de sorbitol/10 mM de Tris, pH 7.5/10 mM de solución de CaCl₂. Los transformantes se seleccionaron en un medio que contenía acetamida como única fuente de nitrógeno (0,6 g/l de acetamida; 1,68 g/l de cloruro de cesio; 20 g/l de glucosa; 15 g/l de fosfato dihidrógeno de potasio; 0,6 g/l de sulfato de magnesio heptahidratado; 0,6 g/l de cloruro de calcio dihidratado; 5 mg/l de sulfato de hierro (II); 1,4 mg/l de sulfato de zinc; 1 mg/l de cloruro de cobalto (II); 1,6 mg/l de sulfato de manganeso (II); 20 g/l de agar; pH 4.25). Aparecieron colonias transformadas (aproximadamente 50-100) en aproximadamente 1 semana. Tras el cultivo sobre placas de acetamida, las esporas se recogieron y se volvieron a seleccionar en placas de acetamida. Tras 5 días, las esporas se recogieron utilizando glicerol al 10 %, y se inocularon 1 x 10⁸ esporas en un frasco de agitación de 250 ml con 30 ml de medio definido de glucosa/soforosa para la expresión proteica. La expresión proteica se confirmó mediante SDS-PAGE. La suspensión de esporas se cultivó posteriormente en un fermentador de 7 l en un medio definido que contenía un 60 % de pienso de glucosa y soforosa. El medio definido (por litro) de glucosa/soforosa consiste en 5 g de (NH₄)₂SO₄, 33 g de tampón PIPPS, 9 g de casaminoácidos, 4,5 g de KH₂PO₄, 1 g de CaCl₂ (anhidro), 1 g de MgSO₄·7H₂O, pH en 5.5 ajustado con un 50 % de NaOH con H₂O Milli-Q para llevar a 966,5 ml. Tras la esterilización, se añadió lo siguiente: 26 ml de glucosa/soforosa al 60 %, y 2,5 ml de oligoelementos 400X de *T. reesei*. *FveXyn4* se purificó a partir de caldo de fermentación concentrado de un cultivo de fermentador de 7 l utilizando dos columnas de cromatografía. El caldo de fermentación concentrado tamponado en 20 mM de tampón fosfato de sodio con pH 6.0 que contenía 1 M de sulfato de amonio se cargó en una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (Fenil sefarosa FF, 26/10). La proteína se eluyó de la columna utilizando un gradiente lineal de tampón de equilibrio/lavado a 20 mM de tampón fosfato de sodio con pH 6.0. La fracción que contenía la proteína *FveXyn4* se cargó en una columna de filtración en gel (HiLoad Superdex 75 pg 26/60), y la fase móvil utilizada era 20 mM de fosfato de sodio, pH 7.0, conteniendo 0,15 M de NaCl. La proteína purificada se concentró utilizando un dispositivo 3K Amicon Ultra-15, y la fracción proteica concentrada se utilizó en posteriores estudios.

[0623] La secuencia de nucleótidos del gen *FveXyn4* se expone como SEQ ID N.º 24. La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas), y el intrón previsto se muestra en negrita y en minúsculas.

[0624] La secuencia de aminoácidos de la proteína *FveXyn4* se expone como SEQ ID N.º 26. La secuencia señal prevista por el *software* SignalP-NN se muestra subrayada. Esta es la preproteína.

[0625] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína *FveXyn4* se expone como la SEQ ID N.º 1. Esta es la forma activa de la enzima. La SEQ ID N.º 27 muestra la preproteína, esto es, antes de la modificación postraduccional. En función del hospedador, puede variar la modificación postraduccional y, por consiguiente, la presente invención abarca también formas maduras y activas de la SEQ ID N.º 27.

EJEMPLO 4**Actividad xilanasa de *FveXyn4* (una xilanasa parental)**

[0626] *FveXyn4* pertenece a la familia glicosil hidrolasa 10 (GH10, número CAZy). La actividad beta 1-4 xilanasa de *FveXyn4* se midió utilizando como sustratos xilano al 1 % procedente de madera de abedul (Sigma 95588) o

arabinosilano al 1 % procedente de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM). El ensayo se llevó a cabo en 50 mM de citrato de sodio con pH 5.3, 0,005 % de tampón Tween-80 a 50 °C durante 10 minutos.

- 5 **[0627]** El azúcar reductor liberado se cuantificó mediante reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico y medición de la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica en relación con una curva estándar de xilosa. En este ensayo, una unidad (U) de xilanasa se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo.

EJEMPLO 5

Perfil de temperatura de FveXyn4 (una xilanasa parental)

- 10 **[0628]** La temperatura óptima de FveXyn4 purificada (una enzima parental) se determinó analizando la actividad xilanasa a temperaturas que variaban entre 40 °C y 75 °C durante 10 minutos en 50mM de tampón citrato de sodio con pH 5.3. La actividad se indicó como actividad relativa en la que la actividad a la temperatura óptima se estableció al 100 %. El perfil de temperatura de FveXyn4 se muestra en la figura 17. Se descubrió que FveXyn4 presentaba una temperatura óptima de 60 °C, y se descubrió que conservaba más del 70 % de actividad máxima entre 45 °C y 64 °C.

15 EJEMPLO 6

Reducción de viscosidad en material a base de cereales (p. ej., para la producción de biocombustibles)

Reducción de viscosidad en el trigo

- 20 **[0629]** En la industria europea del alcohol para combustible, los granos pequeños, como el trigo, la cebada y el centeno, son materias primas habituales, al contrario que en EE. UU., donde se utiliza principalmente el maíz. Estos granos pequeños contienen, junto al almidón, niveles altos de polímeros polisacáridos no amiláceos (PNA), tales como celulosa, betaglucano y hemicelulosa.

[0630] La proporción con la que están representados los distintos PNA difiere para cada materia prima. La Tabla 1 muestra las distintas cantidades de PNA en trigo, cebada y centeno en comparación con algunas otras materias primas.

- 25 Tabla 1: Polisacáridos no amiláceos presentes en distintas materias primas (g kg⁻¹ de materia seca)^{1,2}

	Maíz	Trigo	Centeno	Cebada		Avena	
				Con cascarilla	Sin cascarilla	Con cascarilla	Sin cascarilla
Betaglucano	1	8	16	42	42	28	41
Celulosa	22	17-20	15-16	43	10	82	14
PNC ³ solubles y no solubles	75	89-99	116-136	144	114	150	113
Total de PNA	97	107-119	132-152	186	124	232	116

¹(Bach Knudsen, 1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. Anim. Feed Sci. Technol., 67 (4): 319-338

²Englyst, H. N., Anderson, V. y Cummings, J. H., 1983. Starch and non-starch polysaccharides in some cereal foods. J. Sci. Food Agric., 34: 1434-1440.

³Polisacáridos no celulósicos: PNA como pentosanos, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas proporcionan una alta viscosidad a las papillas de granos. La elevada viscosidad posee un efecto negativo para la producción de etanol, puesto que limitará la concentración de sólidos que se puede utilizar en la maceración y reducirá la eficiencia energética del proceso. Además, las hemicelulosas residuales presentes a lo largo del proceso pueden contribuir a formar incrustaciones en los intercambiadores de calor y en el equipo de destilación. El efecto más grande de una viscosidad alta se observa cuando una papilla se enfría hasta la temperatura de fermentación (32 °C). Esto explica que sea necesario reducir la viscosidad en el proceso en cualquier momento anterior a la etapa de enfriamiento. En función del proceso que se utilice, se necesitan enzimas que funcionen a 60 °C y/o a 85 °C.

[0631] Se pueden añadir enzimas reductoras de viscosidad en distintas etapas del proceso de producción de etanol: durante el mezclado y/o la sacarificación/fermentación. Preferiblemente, las enzimas se añaden durante el mezclado para descomponer la viscosidad inicial.

5 **[0632]** Las ventajas de utilizar enzimas reductoras de la viscosidad en el proceso de producción de etanol son varias:

- Se puede utilizar una mayor cantidad de papilla como sustancia seca en el proceso
- Se puede obtener un contenido más elevado de sólidos del jarabe final
- Mejor transferencia de calor, menor requisito energético
- Reducción de las incrustaciones en el evaporador, lo cual deriva en una reducción de los costes de limpieza
- 10 • Incremento de rendimientos de etanol finales
- Calidad mejorada de DDGS

Métodos

[0633] Se utilizó un analizador rápido de viscosidad (RVA 4500) de Perten Instruments para medir perfiles de viscosidad de una papilla de trigo. Esta papilla de trigo se preparó de acuerdo con el siguiente protocolo:

15 Preparar 60 gramos de suspensión de trigo (para operaciones simultáneas en dos RVA) con un 30 % de DS (34,65 % «tal cual») según se indica a continuación:

- Pesar 20,80 gramos de trigo
- En un vaso de precipitados de 100 ml, pesar 39,20 gramos de agua del grifo y añadir 137 µl de 4N de H₂SO₄
- 20 – Añadir el trigo al agua y agitar durante 5 minutos a máxima velocidad (aproximadamente 500 rpm) con un agitador de hélice
- Transferir 25,0 gramos de suspensión a un vaso de RVA, añadir enzimas diluidas 50 veces y comenzar la operación de RVA (comprobar si el pH inicial está en torno a 5.3)
- Comprobar el pH al final de la operación de RVA (5.6-5.7)

25 **[0634]** En cada experimento (25 gramos de suspensión), se dosificó xilanasa en 25 µg de proteína (por 8,66 g de trigo «tal cual»), correspondiente a 2,9 µg de proteína / g de trigo «tal cual». Se dosificó SPEZYME® CL en 0,15 kg/MT de trigo «tal cual» (2,2 AAU/g «tal cual» o 2,6 AAU/g de DS).

30 **[0635]** Se imitó una licuefacción de trigo convencional en el RVA. Se llevó a cabo el pretratamiento durante 20 minutos a 60 °C, seguido por una etapa de licuefacción durante 30 minutos a 85 °C. Tras al pretratamiento y la licuefacción, la suspensión se enfrió hasta 32 °C para determinar la viscosidad en condiciones de fermentación. El pH de licuefacción se mantuvo entre 5.3-5.7.

[0636] En este experimento, el rendimiento de FveXyn4 se comparó con la variante A, B, C, D y E.

	Viscosidad (mPa*s)						
	Blanco (n=2)	FveXyn4	Variante A	Variante B	Variante C	Variante D	Variante E
Después del pretratamiento (1200 s de tiempo de proceso)	533 ± 16	206	220	232	224	235	240
Después de la licuefacción (3120 s de tiempo de proceso)	347 ± 16	122	125	135	130	141	145
A la temperatura de fermentación (3660 s de tiempo de proceso)	765 ± 20	250	257	282	275	302	298

[0637] Los resultados se muestran arriba y en la Figura 22.

[0638] Estos datos muestran que FveXyn4 y todas las variantes se comportan de manera similar, mostrando una reducción de viscosidad del 55-67 % en comparación con el blanco (únicamente SPEZYME® CL).

35 EJEMPLO 7

Separación de gluten de trigo y almidón

[0639] La separación de la harina de trigo en fracciones de almidón y gluten se aplica industrialmente a gran escala para obtener almidón A de alta calidad y subproductos almidón B y gluten vital. La separación es mejor con la adición de xilanasas.

7.1 Materiales y métodos

- 5 [0640] El siguiente ensayo simula la separación del almidón de trigo de un proceso de masa líquida a 40 °C. En este ensayo, se añade harina de trigo industrial (Cargill) a agua del grifo precalentada (50 °C) para crear una suspensión con 35 % de DS mezclando 1 minuto en una batidora de vaso (Braun). El pH de la suspensión permanece «tal cual» a ~6.1. Se transfieren 100 gramos de esta suspensión al viscosímetro Haake VT550, que se calibra a 40 °C. Tras 1 minuto de incubación, se añade la solución enzimática a la suspensión. Mientras tanto, se monitoriza el perfil de viscosidad antes y después de la adición de enzimas durante 15 minutos en total. Tras la incubación, se toman muestras triplicadas de la suspensión incubada y una muestra de suspensión t_0 para una prueba de centrifugación. Cada muestra de prueba de centrifugación posee un peso total de 22,5 g, que contiene 15,8-15,9 g de muestra de suspensión añadida a 6,6-6,7 g de tubo de centrifuga desechable (15 ml). Todas las muestras se centrifugan en una centrífuga Hermle Z400 durante 15 minutos a 3500 rpm. Los valores Brix se determinan a partir del jarabe de las muestras centrifugadas.

EJEMPLO 8

Clonación de una xilanasa *FoxXyn2* estructural (parental) de *Fusarium oxysporum*

- 20 [0641] La secuencia de nucleótidos del gen *FoxXyn2* aislado de *Fusarium oxysporum* se expone como SEQ ID N.º 30 (figura 4A). La secuencia señal se muestra en negrita, y el intrón previsto se muestra en cursiva y en minúsculas.

[0642] La secuencia de aminoácidos de la proteína *FoxXyn2* se expone como SEQ ID N.º 29 (figura 3A). La secuencia señal se muestra en cursiva.

[0643] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína *FoxXyn2* se expone como la SEQ ID N.º 31 o la SEQ ID N.º 4 (figuras 3B y 3C),

- 25 [0644] El producto proteico del gen *FoxXyn2* pertenece a la familia glicosil hidrolasa 10. Este hecho sugiere que *FoxXyn2* es una glicosil hidrolasa secretada.

EJEMPLO 9

Expresión de la proteína *FoxXyn2* estructural (parental)

- 30 [0645] El gen *FoxXyn2* se amplificó a partir de ADN genómico de *Fusarium oxysporum* utilizando los siguientes cebadores: Cebador 1 5'- ccgcgccgcaccATGAAGCTGTCTTCCTCCTACACC-3' (SEQ ID N.º 34) y Cebador 25'-ccggcgccgccttaTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAG -3' (SEQ ID N.º 35). Tras digerirse con *Not I* y *Asc I*, el producto de PCR se clonó en el vector de expresión pTrex3gM (que se describe en el documento US 2011/0136197 A1) digerido con las mismas enzimas de restricción, y el plásmido resultante se marcó como pZZH135. Se proporciona un mapa plasmídico de pZZH135 en la figura 18. La secuencia del gen *FoxXyn2* se confirmó mediante secuenciación de ADN.

[0646] El plásmido pZZH135 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* con quad suprimido (descrita en WO 05/001036) utilizando el método biolístico (expuesto en Te'o VS *et al.*, J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002). La proteína aislada del sobrenadante de cultivo tras la filtración se utilizó para realizar el análisis SDS-PAGE y el ensayo de actividad xilanasas para confirmar la expresión enzimática.

- 40 [0647] La secuencia de nucleótidos del gen *FoxXyn2* del plásmido de expresión pZZH135 se expone como SEQ ID N.º 4. La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína *FoxXyn2* se expone como la SEQ ID N.º 3.

- 45 [0648] La proteína *FoxXyn2* se purificó a partir del sobrenadante de cultivo utilizando resina de cromatografía de afinidad Blue Sepharose, 6FF, y se utilizaron muestras para la caracterización bioquímica según se describe en ejemplos posteriores.

EJEMPLO 10

Actividad xilanasas de *FoxXyn2* estructural (parental)

- 50 [0649] *FoxXyn2* pertenece a la familia glicosil hidrolasa 10 (GH10, número CAZy). La actividad beta 1-4 xilanasas de *FoxXyn2* se midió utilizando xilano al 1 % procedente de madera de abedul (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1 % procedente de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM) como sustratos. El ensayo se llevó a cabo en 50 mM de citrato de sodio con pH 5.3, 0,005 % de tampón Tween-80 a 50 °C durante 10 minutos.

[0650] El azúcar reductor liberado se cuantificó mediante reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico y medición de la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica en relación con una curva estándar de xilosa. En

este ensayo, una unidad (U) de xilanasa se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto con las condiciones del ensayo.

EJEMPLO 11

Perfil de temperatura de FoxXyn2

- 5 [0651] La temperatura óptima de FoxXyn2 purificada se determinó analizando la actividad xilanasa a temperaturas que variaban entre 45 °C y 94 °C durante 10 minutos en 50mM de tampón citrato de sodio con pH 5.3. La actividad se indicó como actividad relativa, donde la actividad a la temperatura óptima se estableció al 100 %. El perfil de temperatura de FoxXyn2 se muestra en la figura 19. Se descubrió que FoxXyn2 presentaba una temperatura óptima de 60 °C, y se descubrió que conservaba más del 50 % de actividad máxima entre 40 °C y 65 °C.

EJEMPLO 12

Termoestabilidad

- 15 [0652] La termoestabilidad de FveXyn4 de tipo natural (wt) y de las variantes de FveXyn4 se midió a 63 °C (véanse los datos de la Tabla 2). Queda claro que todas las variantes que representan distintos números (2-4) y combinaciones de mutaciones presentan una mayor actividad residual a 63 °C en comparación con FveXyn4, y se puede concluir que todas estas variantes son más termoestables que FveXyn4 de tipo natural (p. ej., que se muestra en el presente documento como SEQ ID N.º 1 o SEQ ID N.º 27).

Materiales y métodos

- 20 [0653] Se obtuvieron variantes de FveXyn4 a partir de genotecas combinatorias o mediante la introducción de mutaciones específicas conforme a lo descrito en el Ejemplo 1. La termoestabilidad de las variantes de FveXyn4 se midió diluyendo y preincubando las muestras de enzimas en 25 mM de tampón MES (0,00125 % de Tween 80 - 25 mM de tampón MES, pH 6.0, 0,00125 % (V:V) de Tween 80), pH 6.0, durante 10 min a 63 °C. Tras la incubación, la actividad residual se midió mediante el método de actividad xilanasa descrito en el Ejemplo 1. La actividad medida sin preincubación se configuró al 100 %, y se calculó la actividad residual de cada variante con la respectiva temperatura en relación con esta.

[0654] La Tabla 2 muestra 14 variantes combinatorias de FveXyn4 con una termoestabilidad significativamente mayor en comparación con el tipo natural de FveXyn4. La termoestabilidad se mide como actividad residual tras la preincubación a 63 °C durante 10 min, según se ha descrito anteriormente en la sección de Materiales y métodos de este Ejemplo 12.

Tabla 2		
Variante	Mutaciones	Actividad residual a 63 °C
FveXyn4	WT (tipo natural)	0,04
1	K79F_A217Q_T298F	0,89
2	N7D_T33V_A217Q_T298F	0,80
3	N7D_K79F_T298F	0,79
4	T33V_K79F_A217Q	0,77
5	N7D_T33V_T298Y	0,76
6	T33V_A217Q_T298Y	0,67
7	N7D_A217Q_T298F	0,65
8	N7D_T33V_A217Q	0,60

Tabla 2		
Variante	Mutaciones	Actividad residual a 63 °C
9	K79F_T298F	0,59
10	N7D_K79F	0,58
11	T33V_K79F	0,57
12	T33V_T298Y	0,55
13	N7D_T33V	0,40
14	T33V_A217Q	0,35

EJEMPLO 13

Recuperación de aceite: efecto de la xilanasas GH10 FveXyn4 (SEQ ID N.º 1) y variantes modificadas de esta en la recuperación de aceite en fermentaciones de etanol de maíz

- 5 **[0655]** Se descubrió que las xilanasas GH 10 FveXyn4 (SEQ ID N.º 1) y la variante E (SEQ ID N.º 21) aumentaban la disponibilidad de aceite libre al final de la fermentación cuando se añadían al principio de las fermentaciones de etanol de maíz a escala de laboratorio.

Materiales y métodos:

Preparaciones enzimáticas:

[0656]

- 10 Xilanasas FveXyn
 Variante E de xilanasas
 SFS de DISTILLASE® (DuPont Industrial Biosciences)

Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

- 15 **[0657]** Las concentraciones de las xilanasas FveXyn4 y la Variante E se determinaron utilizando un ensayo BCA convencional.

- 20 **[0658]** El licuado de maíz para experimentos se obtuvo a través de Big River Resources, Dyersville. Se midió la cantidad inicial de sólidos secos en el licuado, y el pH se ajustó a pH 4.8. Se añadió levadura Fermal™ Gold a un 0,1 % peso/peso y todas las fermentaciones recibieron SFS de DISTILLASE® en una dosis de 0,325 GAU/g de DS (véase la Tabla 3). En fermentaciones con xilanasas, las xilanasas se añadieron a 0,25 mg/g de DS (véase la Tabla 3). Las fermentaciones se llevaron a cabo a 32 °C durante 64 horas, mezclando de forma constante. Cada condición se ejecutó en 15 g a escala, por triplicado.

TABLA 3.

Enzima	Dosis
Control (SFS de DISTILLASE®)	0,325 GAU/g de DS
FveXyn4	0,25 mg/g de DS
Variante E	0,25 mg/g de DS

Medición de aceite:

[0659] Tras 64 horas, las muestras se enfriaron para detener la fermentación y las muestras se procesaron inmediatamente.

5 **[0660]** En una réplica, la papilla resultante se mezcló enérgicamente con 2 ml de hexano; a continuación, se centrifugó a 10 000 rpm durante 2 minutos para separar la capa de hexano-aceite de las capas de sólidos y acuosas. Tras la centrifugación, se pipetearon 10 µl de la capa superior de hexano-aceite en un vial de HPLC de vidrio con tapa de rosca conteniendo 290 µl de hexano, y se mezclaron. Se mide la cantidad de aceite extraído de la papilla completa en la capa de hexano mediante HPLC con un detector de dispersión de luz para obtener el aceite total presente al final de la fermentación.

10 **[0661]** En las otras dos réplicas, la papilla restante se centrifugó en primer lugar a 10 000 rpm durante 2 minutos para permitir la separación física de las fases sólida y líquida. Sin alterar la papilla separada, se añadieron 2 ml de hexano en la parte superior, y la mezcla se agitó suavemente durante 2 minutos en un mezclador orbital. Después de mezclarse, se pipetearon 10 µl de la capa superior de hexano-aceite en un vial de HPLC de vidrio con tapa de rosca que contenía 290 µl de hexano, y se mezclaron. La cantidad de aceite extraído de la capa sobrenadante se mide directamente (sin columna) mediante HPLC con un detector de dispersión de luz para proporcionar el aceite disponible al final de la fermentación.

15 **[0662]** El % de aceite recuperado para cada condición se calcula dividiendo el aceite disponible por el aceite total. Se creó una curva estándar con muestra de hexano que contenía cantidades conocidas de aceite de maíz.

Resultados:

20 **[0663]** Los resultados se muestran en la Figura 23. Con dosis iguales (0,25 mg/g de DS), las tres xilanasas experimentales analizadas incrementaron el % de aceite recuperado al final de la fermentación en comparación con el control sin ninguna xilanasas. La variante E presentó el mayor efecto positivo en lo que respecta a la disponibilidad de aceite, que superó las expectativas basándose en su actividad específica frente a la xilanasas parental FveXyn4. La variante E posee una menor actividad específica que FveXyn4 con pH 5.0 (2600 U/mg frente a 3300 U/mg, respectivamente), y presenta menos capacidad que el tipo natural para solubilizar DDGs de maíz (91 % frente al tipo natural). Véase la Tabla 4.

TABLA 4.

Xilanasas	SPAC pH 5.0 (U/mg)	Solubilización de cDDGs (PI)
FveXyn4	3300	1
Variante E	2600	0,91
		Dosis 36 mg/kg

EJEMPLO 14

[0664] Se ha demostrado que FveXyn4 mejora la disponibilidad de aceite en mezclas de germen y fibra de maíz.

30 Materiales y métodos:

[0665] Sustratos: germen de maíz molido y fibra de maíz en copos de Ingredion Inc.

Enzimas:

[0666]

FERMGEN® (proteasa ácida fúngica de DuPont Industrial Biosciences)

35 Xilanasas XLATHIN® (Verenium Corporation)

Xilanasas FveXyn4

Disolvente: Hexano (para la extracción de aceite)

[0667] Se empleó HPLC con detector CAD para la cuantificación de aceite. Se creó una curva estándar con muestra de hexano que contenía cantidades conocidas de aceite de maíz.

40 **[0668]** Las concentraciones de las muestras enzimáticas se determinaron utilizando un ensayo de proteína BCA convencional. La xilanasas XYLATHIN® y la xilanasas FveXyn4 se diluyeron a 2 ppm (2 mg/l) antes de la dosificación.

5 **[0669]** En tubos de vidrio, se añadieron 15 ml de 25 mM de tampón de acetato (pH 5.0), 5 % (peso/peso) de germen de maíz y 6,5 % (peso/peso) de fibra de maíz. Cada tubo se calentó en un baño de agua a 85 °C y se mantuvo durante 30 minutos, y después se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente. En cada tubo se añadieron 45 µl de FERMGEN®, y se añadieron 6 µl de la xilanasa diluida. A continuación, se incubaron los tubos, con agitación, a 35 °C durante 18 horas. Tras la reacción, el contenido de cada tubo se vertió en un tubo de poliestireno de 50 ml y se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se añadieron con cuidado 2 ml de hexano en la parte superior de cada muestra, y se dio vueltas lentamente a las muestras sin alterar la granulación durante dos minutos en un mezclador orbital. Se realizó una dilución 200 veces de la capa de hexano, y las muestras se cargaron en la HPLC para cuantificarse a través de una curva estándar obtenida
10 previamente. Esta medición proporciona el aceite disponible tras la reacción.

[0670] En una de las muestras, el hexano se agitó enérgicamente durante unos cuantos minutos para obtener el aceite total extraído por el hexano.

[0671] El % de aceite recuperado para cada condición se calcula dividiendo el aceite disponible por el aceite total.

15 Resultados:

[0672] Según se muestra en la figura 24, con dosis equivalentes de proteínas y en combinación con FERMGEN®, las dos xilanasas analizadas incrementaron el % de aceite recuperado de la mezcla de germen de maíz y fibra de maíz en comparación con un control sin xilanasa. FveXyn4 (GH10) fue la que más mejoró el % de recuperación de aceite (52 % frente al 25 % de aceite recuperado con control sin xilanasa), superando el rendimiento de la xilanasa XYLATHIN®, que mostró únicamente un 40 % de aceite recuperado.

REIVINDICACIONES

1. Enzima xilanasa que presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21, comprendiendo la enzima xilanasa los aminoácidos 7D, 33V, 79Y, 217Q y 298Y en posiciones correspondientes a la numeración de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21 y donde la enzima xilanasa posee actividad xilanasa y es capaz de incrementar la recuperación de aceite a partir de material a base de cereales en comparación con la enzima xilanasa de la SEQ ID N.º 1.
2. Enzima xilanasa de acuerdo con la reivindicación 1 donde el aumento de la recuperación de aceite se puede medir al final de la recuperación de aceite de fermentación.
3. Enzima xilanasa de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la enzima xilanasa comprende una de las siguientes combinaciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a la numeración de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21:
 - A: 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
 - B: 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y T298Y; o
 - C: 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q, y 298Y; o
 - D: 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q y T298Y; o
 - E: 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y.
4. Enzima xilanasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima posee al menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21.
5. Enzima xilanasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima posee al menos un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21.
6. Enzima xilanasa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la enzima posee al menos un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º 21.
7. Proceso de recuperación de aceite, comprendiendo:
 - (a) licuar un material a base de cereales en dextrinas con una alfa-amilasa;
 - (b) sacarificar las dextrinas utilizando una enzima que genera una fuente de carbohidratos para formar un azúcar;
 - (c) fermentar el azúcar de un medio de fermentación en un producto de fermentación utilizando un organismo de fermentación;
 - (d) destilar el producto de fermentación para formar un residuo de destilación completo;
 - (e) separar el residuo de destilación completo en residuo de fermentación fino y pasta húmeda; y
 - (f) recuperar el aceite del residuo de destilación fino, donde al menos uno o más de licuar, sacarificar y fermentar comprende mezclar una xilanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Proceso según la reivindicación 7, comprendiendo además una etapa de maceración y/o una etapa de procesamiento posfermentación donde se mezcla dicha enzima xilanasa modificada.
9. Proceso de recuperación de aceite en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS), comprendiendo:
 - (a) mezclar una alfa-amilasa, una enzima que genera una fuente de carbohidratos y un organismo de fermentación con un material a base de cereales en un medio de fermentación;
 - (b) realizar SFS para formar un azúcar en el medio de fermentación y fermentar a continuación el azúcar en un producto de fermentación utilizando el organismo de fermentación;
 - (c) destilar el producto de fermentación para formar un residuo de destilación completo;
 - (d) separar el residuo de destilación completo en residuo de destilación fino y pasta húmeda; y
 - (e) recuperar el aceite del residuo de destilación fino, donde realizar SFS comprende mezclar una xilanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
10. Proceso de recuperación de aceite en un proceso enzimático que hidroliza almidón granular (GSHE), comprendiendo:
 - (a) poner en contacto un material a base de cereales comprendiendo almidón granular a una temperatura igual o inferior a la temperatura de gelatinización del almidón granular con una o más enzima(s) GSHE y una xilanasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;

- (b) permitir que la alfa amilasa, enzima GSHE y xilanasa actúen durante un período de tiempo entre 2 y 100 horas para obtener un jarabe de azúcar fermentable;
 - (c) fermentar el jarabe de azúcar en un producto de fermentación utilizando un organismo de fermentación;
 - (d) destilar el producto de fermentación para formar un residuo de destilación completo;
 - 5 (e) separar el residuo de destilación completo en residuo de destilación fino y pasta húmeda; y
 - (f) recuperar el aceite del residuo de destilación fino.
- 11.** Proceso según la reivindicación 10, donde dicho jarabe de azúcar se selecciona del grupo que consiste en un disacárido, oligosacárido, polisacárido, glucosa, y maltosa y/o el material a base de cereales comprende grano y/o cereal.
- 10 **12.** Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, donde la enzima xilanasa se utiliza en combinación con una o más de las enzimas seleccionadas de entre endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4), celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91), 13-glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), celulasas 35 (E.C. 3.2.1.74), liquenasas (E.C. 3.1.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), aciltransferasas lipídicas (clasificadas generalmente como E.C. 2.3.1.x), fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), fitasas (p. ej., 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), amilasas, alfa-amilasas (E.C. 3.2.1.1), otras xilanasas (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73), glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3), hemicelulasas, proteasas (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x) o 5 una proteasa estable en ácido), enzimas desramificantes, cutinasas, esterases, mananasas (p. ej., una 13-mananasa (E.C. 3.2.1.78)) o cualquier combinación de las mismas.

FIGURA 1A

(SEQ ID N.º 26)

mklssflytaslvaa***IP******T******A******I******E******P******R******Q******A******A******D******S******I******N******K******L******I******K******N******K******G******K******L******Y******Y******G******T******I******T******D******P******N******L******L******G******V******A******K******D******T******A******I******K******A******D******F******G******A******V******T******P******E******N******S******G******K******W******D******A******T******E******P******S******Q******G******K******F******N******F******G******S******F******D******Q******V******V******N******F******A******Q******Q******N******G******L******K******V******R******G******H******T******L******V******W******H******S******Q******L******P******Q******W******V******K******N******I******N******D******K******A******T******L******T******K******V******I******E******N******H******V******T******Q******V******V******G******R******Y******K******G******K******I******Y******A******W******D******V******V******N******E******I******F******E******W******D******G******T******L******R******K******D******S******H******F******N******N******V******F******G******N******D******D******Y******V******G******I******A******F******R******A******A******R******K******A******D******P******N******A******K******L******Y******I******N******D******Y******S******L******D******S******G******S******A******S******K******V******T******K******M******V******P******S******V******K******K******W******L******S******Q******G******V******P******D******G******I******G******S******Q******T******H******L******D******P******G******A******A******G******Q******I******Q******G******A******L******T******A******L******A******N******S******G******V******K******E******V******A******T******E******L******D******I******R******T******A******P******A******N******D******Y******A******T******V******T******K******A******C******L******N******V******P******K******C******I******G******I******T******V******W******G******V******S******D******K******N******S******W******R******K******E******H******D******S******L******L******F******D******A******N******Y******N******P******K******P******A******T******A******V******V******N******A******L******R***

FIGURA 1B

(SEQ ID N.º 27)

IP***T******A******I******E******P******R******Q******A******A******D******S******I******N******K******L******I******K******N******K******G******K******L******Y******Y******G******T******I******T******D******P******N******L******L******G******V******A******K******D******T******A******I******K******A******D******F******G******A******V******T******P******E******N******S******G******K******W******D******A******T******E******P******S******Q******G******K******F******N******F******G******S******F******D******Q******V******V******N******F******A******Q******Q******N******G******L******K******V******R******G******H******T******L******V******W******H******S******Q******L******P******Q******W******V******K******N******I******N******D******K******A******T******L******T******K******V******I******E******N******H******V******T******Q******V******V******G******R******Y******K******G******K******I******Y******A******W******D******V******V******N******E******I******F******E******W******D******G******T******L******R******K******D******S******H******F******N******N******V******F******G******N******D******D******Y******V******G******I******A******F******R******A******A******R******K******A******D******P******N******A******K******L******Y******I******N******D******Y******S******L******D******S******G******S******A******S******K******V******T******K******M******V******P******S******V******K******K******W******L******S******Q******G******V******P******D******G******I******G******S******Q******T******H******L******D******P******G******A******A******G******Q******I******Q******G******A******L******T******A******L******A******N******S******G******V******K******E******V******A******T******E******L******D******I******R******T******A******P******A******N******D******Y******A******T******V******T******K******A******C******L******N******V******P******K******C******I******G******I******T******V******W******G******V******S******D******K******N******S******W******R******K******E******H******D******S******L******L******F******D******A******N******Y******N******P******K******P******A******T******A******V******V******N******A******L******R***

FIGURA 1C

(SEQ ID N.º 1)

Q***A******A******D******S******I******N******K******L******I******K******N******K******G******K******L******Y******Y******G******T******I******T******D******P******N******L******L******G******V******A******K******D******T******A******I******K******A******D******F******G******A******V******T******P******E******N******S******G******K******W******D******A******T******E******P******S******Q******G******K******F******N******F******G******S******F******D******Q******V******V******N******F******A******Q******Q******N******G******L******K******V******R******G******H******T******L******V******W******H******S******Q******L******P******Q******W******V******K******N******I******N******D******K******A******T******L******T******K******V******I******E******N******H******V******T******Q******V******V******G******R******Y******K******G******K******I******Y******A******W******D******V******V******N******E******I******F******E******W******D******G******T******L******R******K******D******S******H******F******N******N******V******F******G******N******D******D******Y******V******G******I******A******F******R******A******A******R******K******A******D******P******N******A******K******L******Y******I******N******D******Y******S******L******D******S******G******S******A******S******K******V******T******K******M******V******P******S******V******K******K******W******L******S******Q******G******V******P******D******G******I******G******S******Q******T******H******L******D******P******G******A******A******G******Q******I******Q******G******A******L******T******A******L******A******N******S******G******V******K******E******V******A******T******E******L******D******I******R******T******A******P******A******N******D******Y******A******T******V******T******K******A******C******L******N******V******P******K******C******I******G******I******T******V******W******G******V******S******D******K******N******S******W******R******K******E******H******D******S******L******L******F******D******A******N******Y******N******P******K******P******A******T******A******V******V******N******A******L******R***

FIGURA 2A

(SEQ ID N.º 24)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATC
GAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTA
CTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATCATCAA
GGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCA
GCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCCCAGCAGAATG
GCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTGGGTAAAGA
ACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTG
GACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG**gtatgtttattccccagacttcttcgaaatgactttgctaaca**
tggtcag**GACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACT**
TCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGG
CTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCA
AGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTC
GACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGC
TCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCG
CACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTG
CATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAG
TCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTC
CGCTAA

FIGURA 2B

(SEQ ID N.º 25)

**ATGAAGCTGTCTTCTTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATC
GAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTA
CTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATCATCAA
GGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCA
GCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCCCAGCAGAATG
GCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTGGGTAAAGA
ACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTACCCCAAGTCGTTG
GACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGAC
GGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGC
ATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTAC
AGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAA
GTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCG
GTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGG
TTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCA
AGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGA
ACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTG
CTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA**

FIGURA 2C

(SEQ ID N.º 2)

ATTCCCACGCCATCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTA
CGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTA
CCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTT
GTCAACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTGGGT
TAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGG
GCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAAC
AACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTA
CATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGC
TCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCAATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGT
GCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAA
CGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACA
AGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTT
GTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 3A

(SEQ ID N.º 28)

mklsflytaslvaa***IPTAIEPR***QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENS
GKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIE
NHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNAKL
YINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANS
GVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNP
KAAYTAVVNALR

FIGURA 3B

(SEQ ID N.º 29)

IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENS
GKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKV
IENHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKAD
PNAKL
YINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANS
GVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNP
KAAYTAVVNALR

FIGURA 3C

(SEQ ID N.º 3)

QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENS
GKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKV
IENHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKAD
PNAKL
YINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANS
GVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNP
KAAYTAVVNALR

FIGURA 4A

SEQ ID N.º 30

ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATC
GAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTA
CTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATCATCAA
GGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCGAGCCCA
GCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCAGCAGAATG
GCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAGTGGGTAAAGA
ACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCACCAACGTCGTTG
GACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG*gtatgtttcttcactcgaacttctataaatggctttactaacat*
*gttcag*GACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTT
CAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCCGCAAGGC
TGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAA
GGTCACCAAGGGCATGGTTCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCTG
ACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTC
TCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCA
CTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCA
TTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCC
TTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCG
CTAA

FIGURA 4B

SEQ ID N.º 31

**ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATC
GAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTA
CTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATCATCAA
GGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCGAGCCCA
GCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCAGCAGAATG
GCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAGTGGGTAAAGA
ACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCACCAACGTCGTTG
GACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTAAACGAGATCTTCGACTGGGATG
GTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCA
TTGCCTTCCGCGCTGCCCCGAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACA
GCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCTCTGTCAAGAAGT
GGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGT
GCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACCTCTGGTGTGAAGGAGGTT
GCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAG
GCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAAC
TCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCT
TAACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA**

FIGURA 4C

SEQ ID N.º 4

ATTCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTA
CGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATCATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCA
CACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTC
GTCAACTTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAGTGGGT
TAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCACCAACGTCGTTGGACGCTACAAGG
GCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAAC
AACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCC GCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTA
CATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCCTCTGTCAAGAAGTGGC
TCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGT
GCTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAA
CGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACA
AGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTT
GTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 5

SEQ ID N.º 5

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAVIKADFGAVTPENSGKWDATPEPSQGNFNFSGSFDQVVNFAQQNG
LKVRGHTLVVHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDY
VGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSASASKVTKGMVPSVKKWLSQGVVPVDGIGSQSHLDPGAAGQVQGALTALANS
GVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDSNYNPKPAYTAVVNALR

FIGURA 6A

SEQ ID N.º 32

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATC
GAGCCCCGCCAGGCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTA
CTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTCATCAA
GGCCGACTTTGGCGCCGTCACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCC
AGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCICAGCAGAAT
GGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTGGGTAAAG
AACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTT
GGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG**gtatgttttcttgccctcgaccttctcaagatgaatttgctaa**
catgttcagGACGTIGTCAACGAGATCTTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGATTCTCAC
TTCAACAACGTCTTCGGCAACGAIGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAG
GCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCCAGCGCCTCC
AAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGT
CGACGGCATTGGCTCCCAGICTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAGTCCAGGGTG
CTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCC
GCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAAACGTCCCCAAG
TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGAC
AGCCTTCTGTTCGACCAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTC
TCCGCTAA

FIGURA 6B

(SEQ ID N.º 33)

ATGAAGCTGTCTTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATC
GAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTA
CTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTCATCAA
GGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCC
AGCCAGGGCAAATTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTGTCAACTTTGCICAGCAGAAT
GGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTGGGTTAAG
AACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTT
GGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCAACGAGATCTTCGACTGGGAC
GGTACCCTCCGAAAGGATTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCA
TTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACA
GCCTCGACTCCGCGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCCTCCGTCAAGAAG
TGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCAGTCTCACCTTGACCCCGG
TGCCGCTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATCTGGTGTCAAGGAGG
TTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTCACCA
AGGCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGA
ACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTGACTCCAACCTACAACCCCAAGCCTG
CTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 6C

(SEQ ID N.º 6)

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCGCGCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTA
CGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTCA
CCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTC
GTCAACTTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTGGGT
TAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGG
GCAAGATCTACGCCTGGGACGTTGTC AACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGATTCTCACTTCAAC
AACGTCTTCGGCAACGAIGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTA
CATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCTCCGTCAAGAAGTGGC
TCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCAGICTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAGTCCAGGGT
GCTCTCACTGCCCTCGCCACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAA
CGACTACGCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACA
AGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCGACTCCAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTT
GTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 7

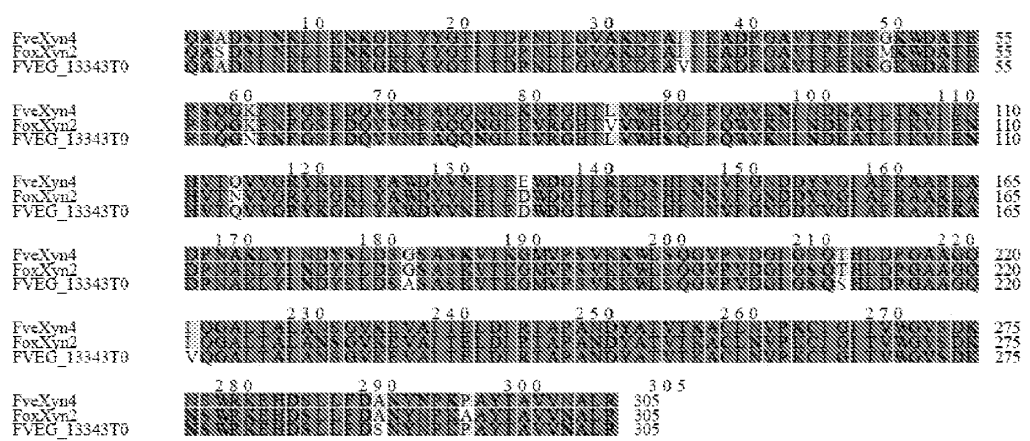


FIGURA 8

SEQ ID N.º 7

>secuencia de codificación de variante de enzima A (1 pb – 987 pb, directa) 987 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTACCTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
AGGACTCTCACTTCAACCAGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAA
GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACC
AAGGGTATGGTTCCCTACGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
CTCACCTTGACCCCGGTACGGCTCCCAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
GGAGGTGGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
TGCCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGG
AGCACGACAGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
CCGCTAA

SEQ ID N.º 8

>secuencia de codificación de variante de enzima B (1 pb – 987 pb, directa) 987 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
AGGACTCTCACTTCAACCAGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAA
GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACC
AAGGGTATGGTTCCCTACGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
CTCACCTTGACCCCGGTACGGCTCCCAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
GGAGGTGGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
TGCCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGG
AGCACGACAGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
CCGCTAA

FIGURA 8 Continuación

SEQ ID N.º 9

>secuencia de codificación de variante de enzima C (1 pb – 987 pb, directa) 987 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCCCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CCCTCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTACCCAAGTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCTGCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAA
GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC
AAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
CTCACCTTGACCCGGTCAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
TGCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGCGCAAGG
AGCACGACAGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
CCGCTAA

SEQ ID N.º 10

>secuencia de codificación de variante de enzima D (1 pb – 987 pb, directa) 987 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCCCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTACCCAAGTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCTGCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA
AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAA
GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC
AAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
CTCACCTTGACCCGGTCAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
TGCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGCGCAAGG
AGCACGACAGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
CCGCTAA

FIGURA 8 Continuación

SEQ ID N.º 11

>secuencia de codificación de variante de enzima E (directa) 987 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCCTCCGAA
AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAA
GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC
AAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA
CTCACCTTGACCCCGGTCAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA
GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC
TGCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGG
AGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT
CCGCTAA

FIGURA 9

SEQ ID N.º 12

>variante de enzima A (121 pb – 1159 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTATTTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACC
AGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC
GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATACCGA
GCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
TGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGCTCTGACAAGAAGTCTTGCGCAAGGAGCAGCAGCTCTCTGT
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

SEQ ID N.º 13

>variante de enzima B (121 pb – 1159 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTATTTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACC
AGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC
GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATACCGA
GCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
TGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGCTCTGACAAGAAGTCTTGCGCAAGGAGCAGCAGCTCTCTGT
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 9 Continuación

SEQ ID N.º 14

>variante de enzima C (121 pb – 1159 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCAGCC
CCCTCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTATTCCTCCCGAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA
ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC
GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAGGAGGTTGCCATACCGA
GCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
TGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCAGACAGTCTTCTGT
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

SEQ ID N.º 15

>variante de enzima D (46 pb – 1084 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCAGCC
CAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTATTCCTCCCGAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA
ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC
GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAGGAGGTTGCCATACCGA
GCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
TGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCAGACAGTCTTCTGT
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 9 Continuación

SEQ ID N.º 16

>variante de enzima E (46 pb – 1084 pb, directa) 1039 pb

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCACCGCCATCGAGCCCCGCC
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC
CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA
CAATGTTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA
ACGTCCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC
GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC
AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA
GCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG
TGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCAGACAGTCTTCTGT
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 10

SEQ ID N.º 17

>variante de enzima A madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFGSFDQVV
NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKAMLTKEIENHVTQLVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTGKMPYVKKWLSQGVVPDVGIGSQ
THLDPGQAGQIQGALTALANSVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
EHDSLLFDANYNPKPAYAVVNALR*

SEQ ID N.º 18

>variante de enzima B madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFTSFDQVV
NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKAMLTKEIENHVTQLVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSQSASKVTGKMPYVKKWLSQGVVPDVGIGSQ
THLDPGQAGQIQGALTALANSVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
EHDSLLFDANYNPKPAYAVVNALR*

SEQ ID N.º 19

>variante de enzima C madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFGSFDQVV
NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTKIENHVTQVVGRIYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSGSASKVTGKMPVSVKKWLSQGVVPDVGIGSQ
THLDPGQAGQIQGALTALANSVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
EHDSLLFDANYNPKPAYAVVNALR*

SEQ ID N.º 20

>variante de enzima D madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFTSFDQVV
NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTKIENHVTQVVGRIYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSGSASKVTGKMPVSVKKWLSQGVVPDVGIGSQ
THLDPGQAGQIQGALTALANSVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
EHDSLLFDANYNPKPAYAVVNALR*

SEQ ID N.º 21

>variante de enzima E 306 aa

QAADSIDKLIKNGKLYYGTITDPPLLGVAKDVAIIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFTSFDQVV
NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTKIENHVTQVVGRIYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLR
KDSHFNNVFGNDDYVGIAFRAARKADPNKLYINDYSLDSGSASKVTGKMPVSVKKWLSQGVVPDVGIGSQ
THLDPGQAGQIQGALTALANSVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPKCIGITVWGVSDKNSWRK
EHDSLLFDANYNPKPAYAVVNALR*

FIGURA 11

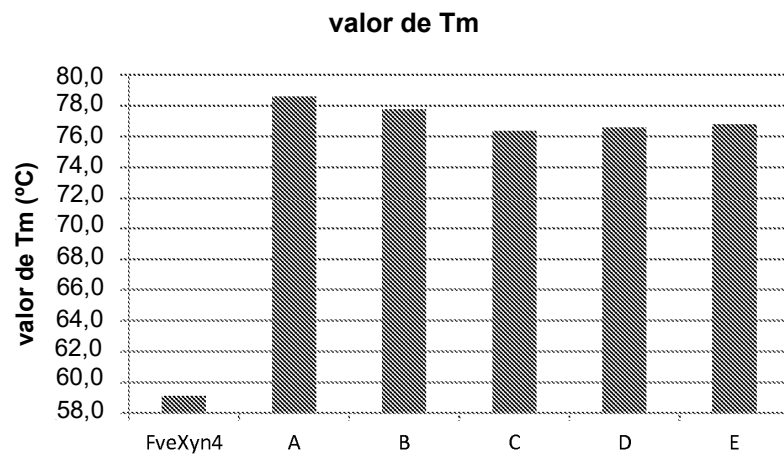


FIGURA 12

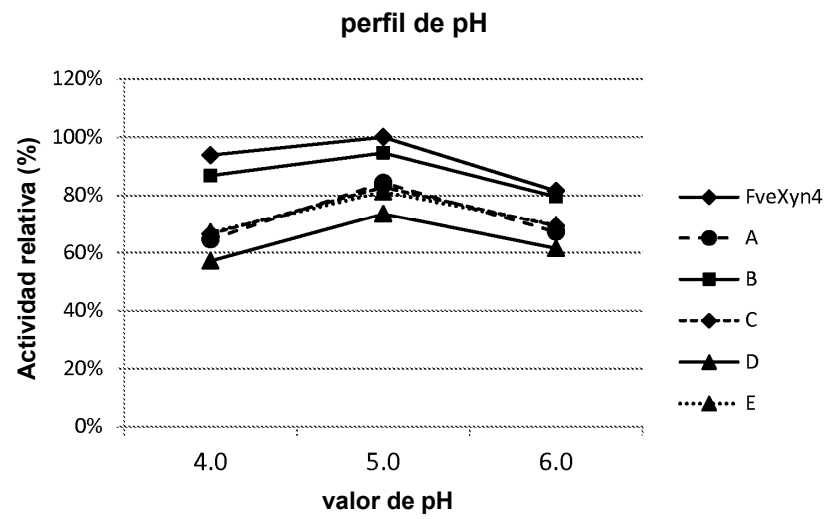


FIGURA 13a

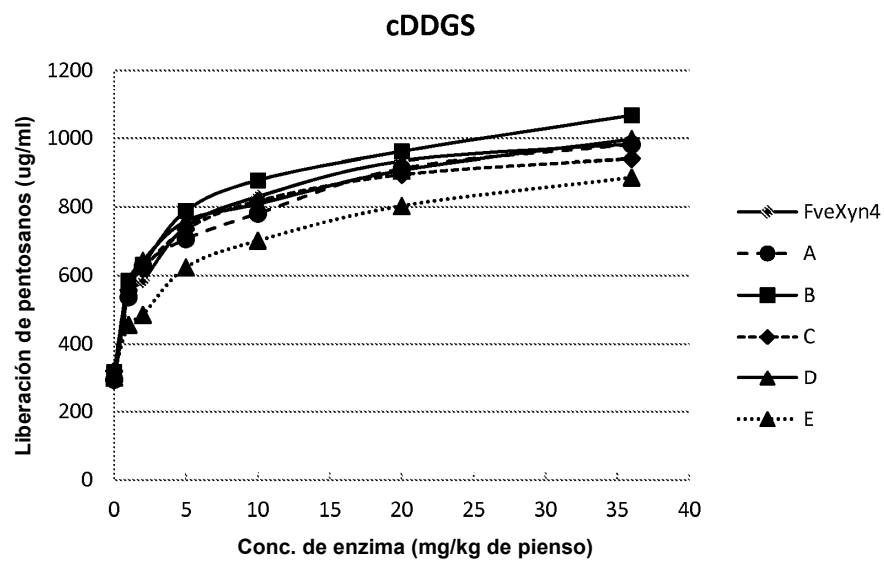


FIGURA 13b

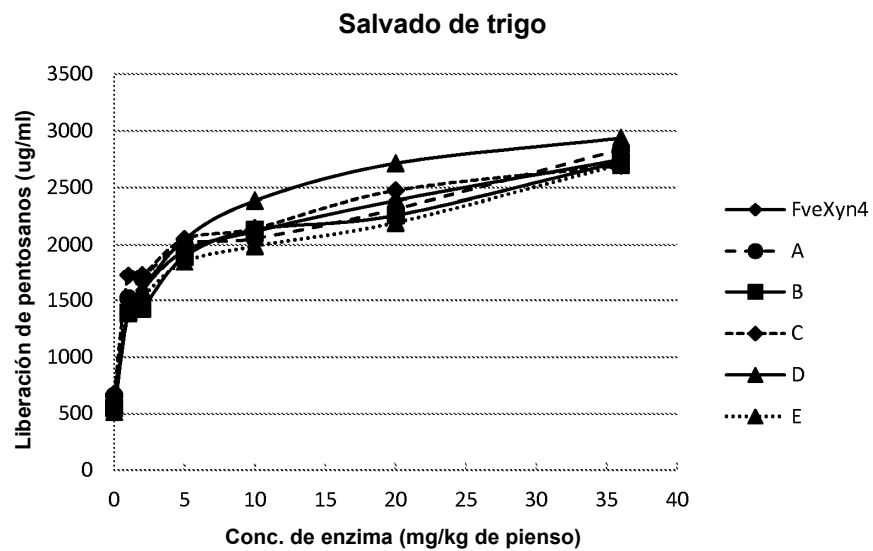


FIGURA 14

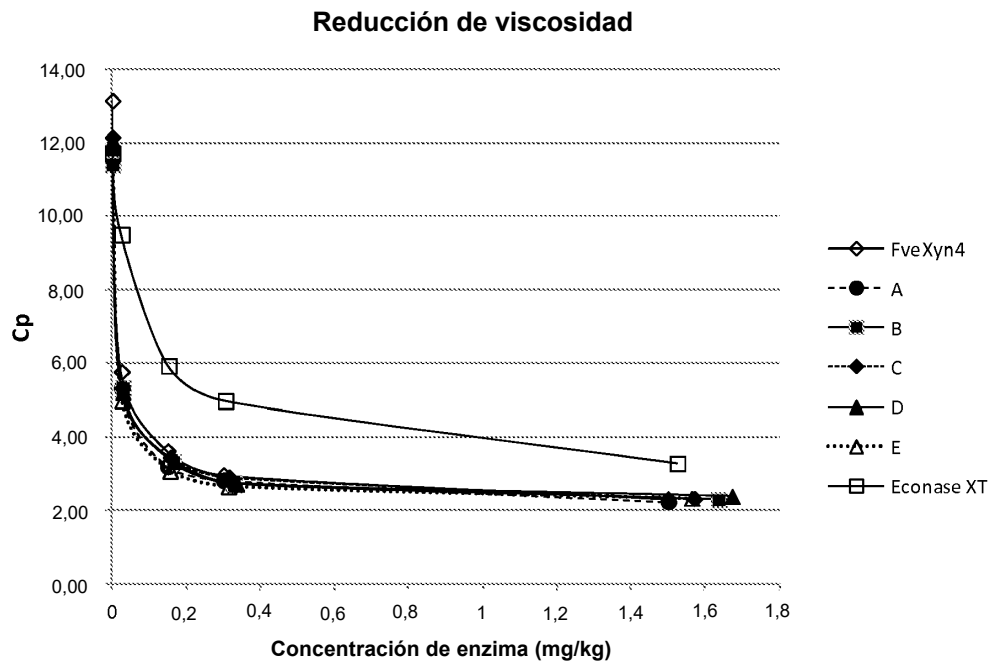


FIGURA 15

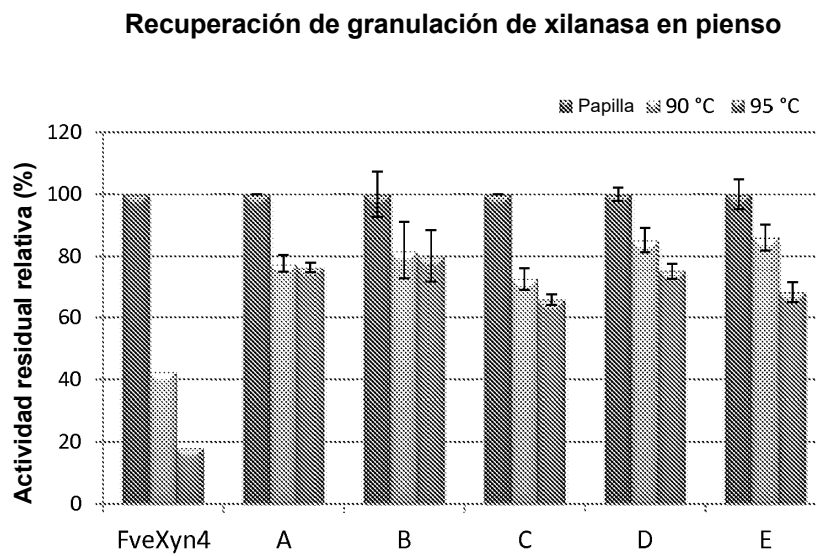


FIGURA 16

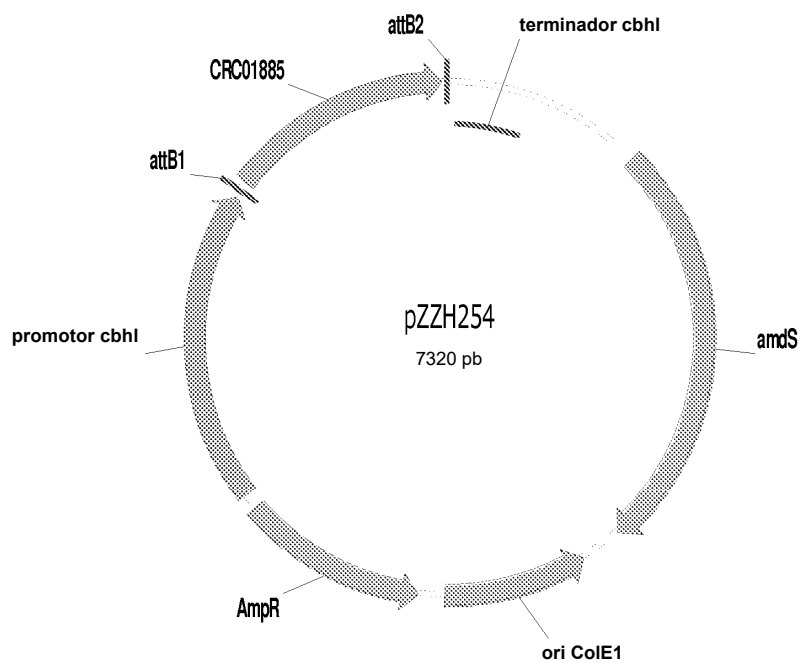


FIGURA 17

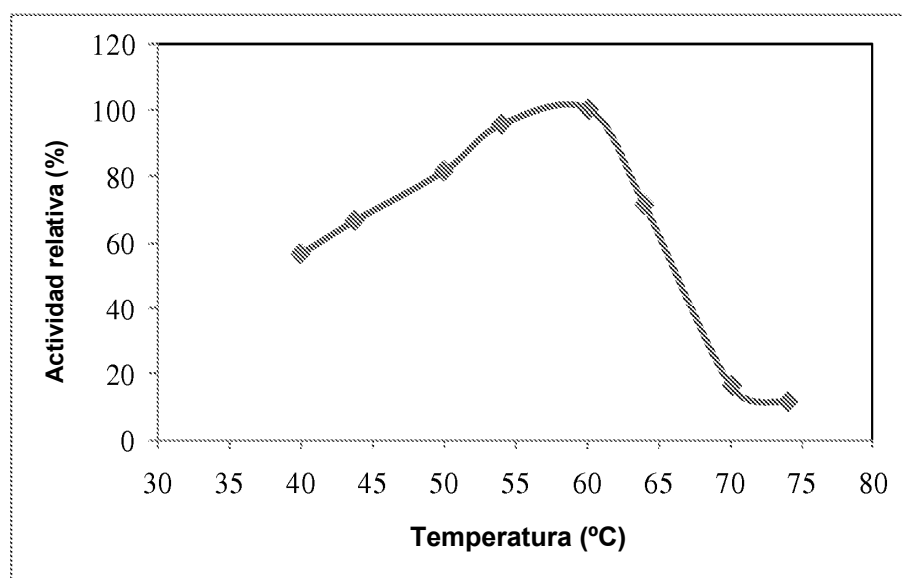


FIGURA 18

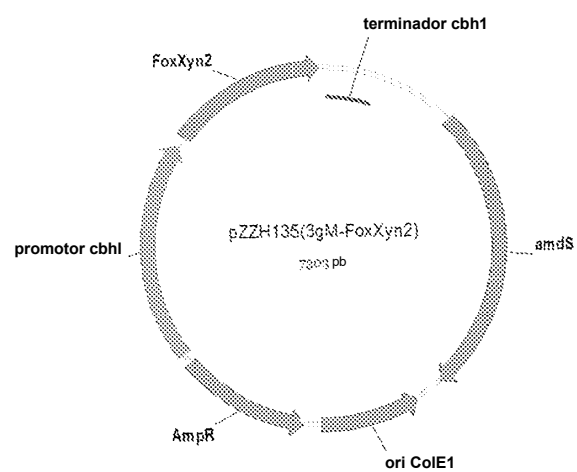


FIGURA 19

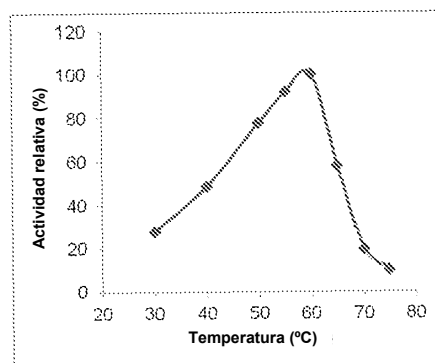


FIGURA 20

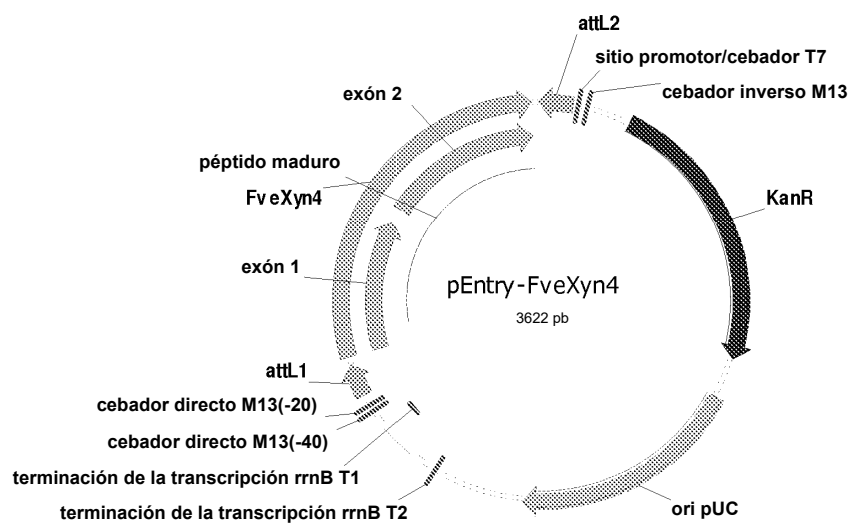


FIGURA 21

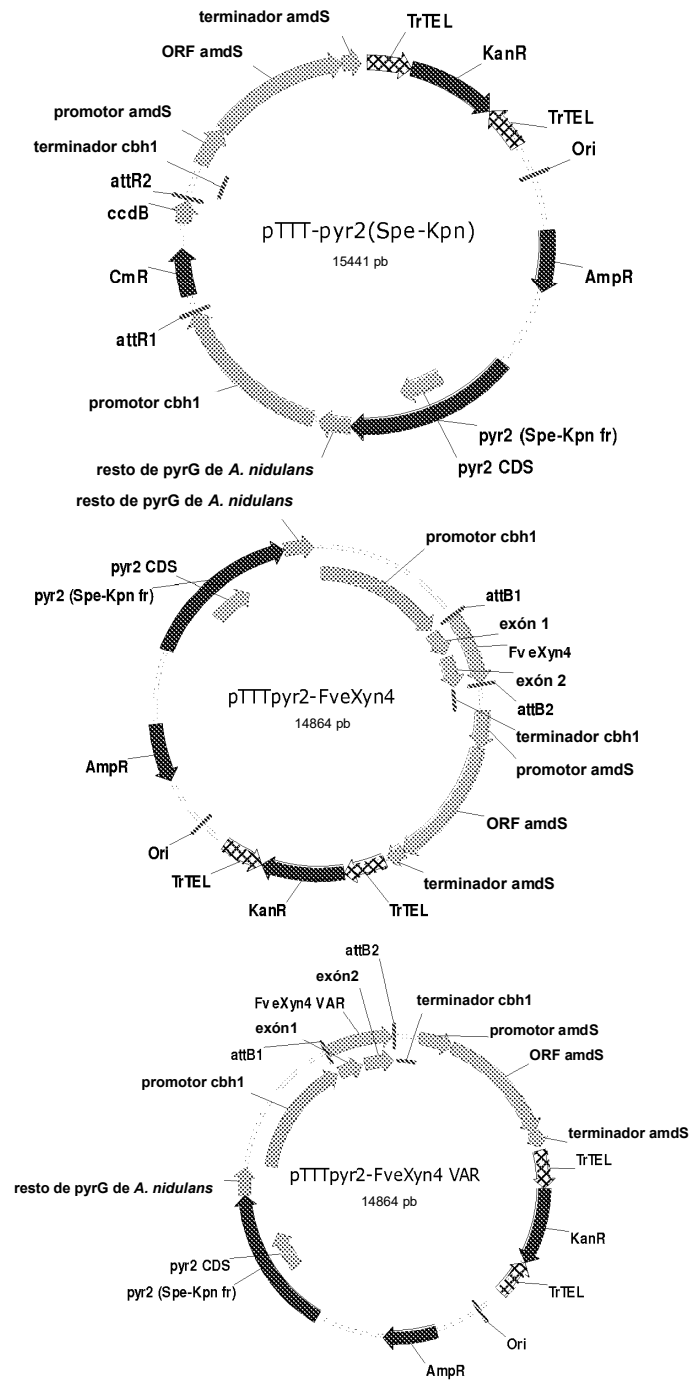


FIGURA 22

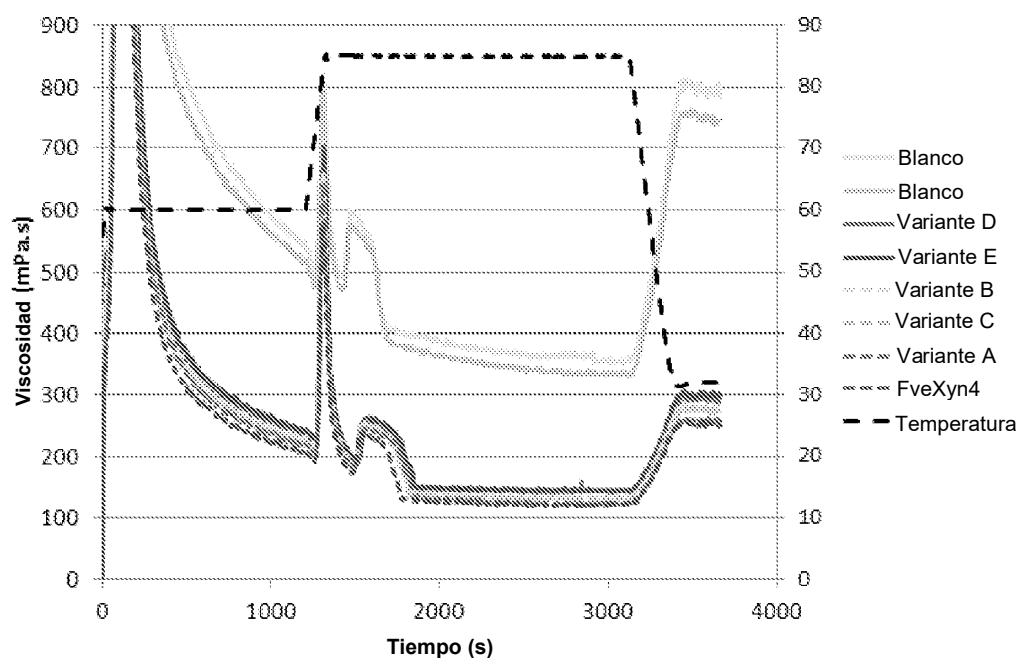


FIGURA 23

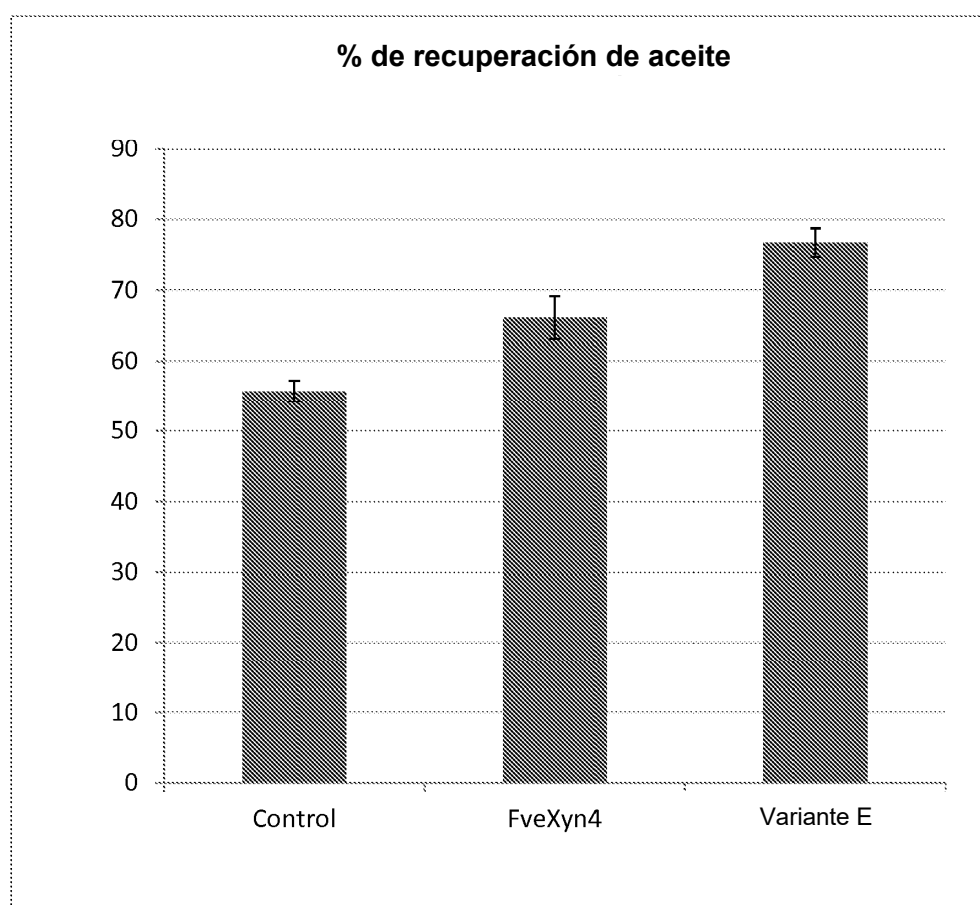


FIGURA 24

