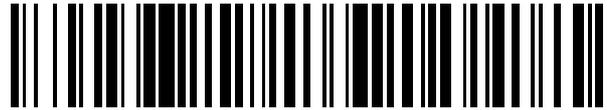


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 402**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2015 PCT/US2015/037732**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2015 WO15200659**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2015 E 15734528 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3161133**

54 Título: **Variantes de xilanasas y polinucleótidos que las codifican**

30 Prioridad:

25.06.2014 EP 14173811

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

13.05.2019

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**SCOTT, BRIAN R.;
WOGULIS, MARK;
PEDERSEN, SVEN y
LAVIGNE, JAMES**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 712 402 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

Variantes de xilanasas y polinucleótidos que las codifican

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un Listado de Secuencias en formato legible por ordenador.

Antecedentes de la invención

10

Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a variantes de xilanasas, polinucleótidos que codifican las variantes, métodos para producir las variantes y métodos para usar las variantes.

15

Descripción de la técnica relacionada.

[0003] Los polisacáridos de la pared celular vegetal constituyen aproximadamente el 90% de la pared celular vegetal y se pueden dividir en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina. La celulosa representa el componente principal de los polisacáridos de la pared celular. Las hemicelulosas son el segundo constituyente más abundante de las paredes celulares vegetales. El principal polímero de hemicelulosa es el xilano.

20

[0004] El xilano es un polímero de D-xilosa unido por enlaces beta-1,4-xilosídicos. El xilano se puede degradar a xilosa y xilo-oligómeros por hidrólisis ácida o enzimática. La hidrólisis enzimática de xilano produce azúcares libres sin los subproductos formados con ácido (p.ej., furanos).

25

[0005] Las enzimas capaces de degradar el xilano y otros polisacáridos de la pared celular vegetal son importantes para la industria alimentaria, principalmente para la panadería y en el procesamiento de frutas y verduras como la producción de zumos de frutas o la elaboración de vino, donde se utiliza su capacidad para catalizar la degradación de la cadena principal o las cadenas laterales del polisacárido de la pared celular vegetal (Visser et al., Xylans and Xylanases, Proceedings of an International Symposium, Wageningen, The Netherlands, Elsevier Science Publishers, 1992). La biodegradación de la cadena principal de xilano depende de dos clases de enzimas: endoxilanasas y beta-xilosidasas. Las endoxilanasas (EC 3.2.1.8) dividen la cadena principal del xilano en oligosacáridos más pequeños, que pueden degradarse más a xilosa por las beta-xilosidasas (EC 3.2.1.37). Otras enzimas involucradas en la degradación del xilano incluyen, por ejemplo, la acetilxilano esterasa, arabinasa, alfa-glucuronidasa, feruloil esterasa y esterasa de ácido p-cumárico.

30

35

[0006] Otras aplicaciones para las xilanasas son la descomposición enzimática de desechos agrícolas para la producción de combustibles alcohólicos, el tratamiento enzimático de piensos para animales para la hidrólisis de pentosanos, la fabricación de pulpas para disolver que producen celulosa y el bioblanqueo de pulpa de madera [Detroy R. W. In: Organic Chemicals from Biomass, (CRC Press, Boca Raton, Fla., 1981) 19-41; Paice y Jurasek, J. Wood Chem. Technol. 4: 187-198; Pommier y Fuentes, 1989, Tappi Journal 187-191.; Senior et al., 1988, Biotechnol. Letters 10: 907-9121].

40

45

[0007] El xilano es abundante en las paredes celulares vegetales. El arabinoxilano, en particular, es abundante en los cereales, como el trigo, la cebada y el centeno. Las formas solubles de arabinoxilano hacen que las pulpas acuosas de estos granos sean altamente viscosas. Las xilanasas descomponen el (arabino)xilano y liberan azúcares de cadena corta solubles. Las xilanasas, como las de las familias GH 5, 8, 10 y/u 11, pueden usarse en aplicaciones de bioetanol para reducir la viscosidad y mejorar los rendimientos de azúcares fermentables. Sin embargo, los granos de cereal producen proteínas inhibitoras que se unen a muchas xilanasas microbianas y las vuelven ineficaces.

50

[0008] EP695349 describe una xilanasas GH10 de *Aspergillus aculeatus*.

55

[0009] WO2006/078256 describe una xilanasas GH10 de *Aspergillus fumigatus*.

[0010] La presente invención proporciona variantes de una xilanasas con propiedades mejoradas en comparación con su enzima progenitora.

60

Resumen de la invención

[0011] En particular, la presente invención proporciona una variante de la xilanasas de *Aspergillus fumigatus* de tipo salvaje descrita en WO 2006/078256 con una tolerancia mejorada a los inhibidores en comparación con la enzima de tipo salvaje.

65

La presente invención se refiere a una variante de xilanasas, que comprende una sustitución al menos en una posición correspondiente a la posición 87 del polipéptido de la SEQ ID n°: 3, en la que la variante tiene actividad

de xilanasas y tiene una tolerancia incrementada a inhibidores de xilanasas en comparación con la xilanasas de la SEQ ID nº 3; y

en la que la variante tiene al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID Nº: 3; y en donde la sustitución es H87Y.

[0012] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las variantes; construcciones de ácidos nucleicos, vectores y células hospedadoras o plantas transgénicas que comprenden los polinucleótidos; y métodos de producción de las variantes.

[0013] Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende las etapas de: (a) licuar material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa; (b) sacarificar el material licuado; y (c) fermentarlo con un organismo fermentador; donde la variante de xilanasas de la invención está presente durante la etapa (a).

[0014] Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para producir un producto de jarabe a partir de material que contiene almidón, que comprende la etapa de: (a) mezclar el material que contiene almidón seco con agua para formar una pulpa, (b) licuar el material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa; (c) sacarificar el material licuado en presencia de una glucoamilasa, donde la variante de xilanasas de la invención está presente durante la etapa (a) y/o (b).

[0015] Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, que comprende:

- (a) sacarificación de un material celulósico o que contiene xilano con una composición enzimática en presencia de la variante de xilanasas de la invención;
- (b) fermentar el material celulósico sacarificado o que contiene xilano con uno o más microorganismos de fermentación para producir el producto de fermentación; y
- (c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.

[0016] Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende la variante de la invención.

[0017] Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para degradar un material que contiene xilano, que comprende: tratar el material de xilano con una composición enzimática de la invención.

[0018] Otro aspecto de la invención se refiere a una formulación de caldo completo o composición de cultivo celular, que comprende la variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

Breve descripción de las figuras

[0019]

La Figura 1 muestra los perfiles de termoactividad des xilanasas GH10 de *Aspergillus fumigatus* (AfumGH10) y *Aspergillus aculeatus* (AacuGH10). Las xilanasas se incubaron con arabinoxilano de trigo durante 1 hora a varias temperaturas en citrato de sodio 50 mM, pH 5,0. La actividad se midió utilizando una técnica de cuantificación de azúcares reductores por DNS. Las actividades que se muestran a cada temperatura son relativas a la actividad máxima para cada xilanasas. La GH10 de *A. fumigatus* conserva una fracción mucho mayor de su actividad máxima a temperaturas más altas, lo que indica que es más termoactiva y/o más termoestable que la GH10 de *A. aculeatus*.

La Figura 2 muestra que la AfumGH10 de tipo salvaje se ve notablemente afectada por los inhibidores derivados del trigo, mientras que los efectos sobre la AacuGH10 fueron insignificantes en estas condiciones. Las xilanasas se incubaron previamente con varias diluciones de inhibidores derivados del trigo durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se analizaron para determinar su actividad en arabinoxilano de trigo a 50 °C, pH 5,0.

La Figura 3 muestra que la variante H87Y es significativamente más tolerante a los inhibidores derivados del trigo que la AfumGH10 de tipo salvaje. Las enzimas se preincubaron primero con varias diluciones de una preparación de inhibidores del trigo y luego se analizaron para determinar la actividad residual en arabinoxilano de trigo.

La Figura 4 demuestra que la mutación H87Y no confiere efectos negativos sobre la termoestabilidad de la AfumGH10. Las enzimas se incubaron con arabinoxilano de trigo durante 1 h a las temperaturas indicadas y luego se midieron las concentraciones de xilosa utilizando una técnica de determinación de azúcares reductores. Esta figura también muestra que la AfumGH10, tanto la variante de tipo salvaje como la H87Y, tiene una termoactividad más alta que la actividad de xilanasas en la enzima de procesamiento de cereales comercial Optimash TBG.

Definiciones

[0020] **Actividad de xilanasa:** El término "xilanasas" se define aquí como una 1,4-beta-D-xilano-xilano-hidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endohidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en los xilanos. Para los fines de la presente invención, la actividad de xilanasa se determina con arabinoxilano de trigo al 0,5% en tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 5,0 a 50 °C. Una unidad de actividad de xilanasa se define como 1,0 μmol de equivalentes de xilosa producidos por minuto a 50 °C, pH 5,0 de arabinoxilano al 0,5% como sustrato en tampón de citrato de sodio 100 mM, pH 5,0. En algunos casos, la actividad de xilanasa se mide durante incubaciones a temperaturas más altas con arabinoxilano de trigo, condiciones en las que la xilanasa puede inactivarse durante el ensayo. En este caso, la actividad se denomina actividad de xilanasa "aparente". En una realización, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos el 75%, preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 85%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, de la manera más preferible al menos el 95%, y aún más preferiblemente al menos el 100% de la actividad de xilanasa del polipéptido de la SEQ ID n°: 3 que comprende además la sustitución H87Y, y donde la variante de xilanasa tiene al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o al menos un 99%, pero menos de 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID n°: 3.

[0021] En una realización, la actividad de xilanasa se determina como actividad relativa en presencia de inhibidores de xilanasa extraídos del trigo como se describe en los ejemplos.

[0022] La variante de la invención tiene un aumento en la actividad relativa de xilanasa sobre la xilanasa de tipo salvaje de al menos un factor 7x, particularmente 8x, particularmente 8,5x, más particularmente 9x, en presencia de inhibidores de xilanasa de trigo, particularmente XIP-1, en cantidades que reducirán la actividad de xilanasa de tipo salvaje a menos del 10%.

[0023] **Inhibidor de xilanasa:** El término "inhibidor de xilanasa" se define en el presente documento como proteínas inhibidoras producidas en granos de cereales (gramíneas cuyas semillas se usan para alimentos). En particular, el grano de cereal es el trigo. Más particularmente, las proteínas inhibidoras se seleccionan de un grupo que comprende proteína inhibidora de la xilanasa (XIP), inhibidor de xilanasa de *T. aestivum* (TAXI) e inhibidor de xilanasa de tipo taumatina (TLXI). Los inhibidores proteicos de las xilanasas que se encuentran en cereales distintos del trigo son similares en estructura y propiedades a la XIP y al TAXI del trigo y se denominan proteínas de tipo XIP y tipo TAXI. XIP comprende un grupo de proteínas homólogas codificadas por diferentes genes, entre las que XIP-I es la más abundante. De manera similar, TAXI no es una única proteína, sino que comprende dos proteínas, TAXI-I y TAXI-II. Además, los inhibidores TAXI y de tipo TAXI tienen cada uno dos isoformas que resultan del procesamiento proteolítico de la proteína madura. Se les conoce como TAXI-IA, TAXI-IB, TAXI-IIA y TAXI-IIB. Aún más particularmente, las proteínas inhibidoras se seleccionan de un grupo que comprende XIP-I, TAXI-IA, TAXI-IB, TAXI-IIA, TAXI-IIB y TLXI de trigo y sus homólogos en otros cereales.

[0024] Las xilanasas microbianas difieren en su sensibilidad y especificidad a XIP, TAXI y TLXI (descrito por Gusakov, Biochemistry (Moscú), 2010). Los inhibidores de XIP-I o de tipo XIP-I inhiben muchas xilanasas fúngicas de la familia 11 y 10, mientras que generalmente no inhiben las xilanasas GH11 bacterianas. Se han publicado (Payan et al., 1994) estructuras cristalinas de XIP-I en complejo con una xilanasa GH10 de *Aspergillus nidulans* y una xilanasa GH11 de *Penicillium funiculosum*. Las proteínas TAXI, o de tipo TAXI, inhiben las xilanasas fúngicas y bacterianas de la Familia 11, pero por lo general no afectan a las de la Familia GH 10.

[0025] **Familia 10 o Familia GH10 o GH10:** El término "Familia 10" o "Familia GH10" o "GH10" se define en este documento como un polipéptido que se incluye en la Familia 10 de glucósido hidrolasas según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat y Bairoch, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

[0026] **Material que contiene xilano:** El término "material que contiene xilano" se define en este documento como cualquier material que comprenda xilano como constituyente. El xilano es un polisacárido de la pared celular vegetal que contiene una cadena principal de residuos de xilosa con enlaces beta-1,4. Las cadenas laterales de ácido 4-O-metilglucurónico y arabinosa están generalmente presentes en cantidades variables, junto con grupos acetilo y feruloilo. El xilano es un componente importante de la hemicelulosa.

[0027] **Variante alélica:** el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0028] **ADNc:** el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro empalmado obtenida a partir de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El

transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo corte y empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

5 [0029] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como, TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

10 [0030] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" significa secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, procedente del mismo gen) o extraña (es decir, procedente de un gen diferente) respecto al polinucleótido que codifica la variante o nativas o extranjeras entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, 15 promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

20 [0031] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una variante, incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

25 [0032] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente enlazado a secuencias de control que permiten su expresión.

30 [0033] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del terminal amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de xilanasas.

35 [0034] **Condiciones de alta astringencia:** el término "condiciones de alta astringencia" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 65°C.

40 [0035] **Célula hospedadora:** el término "célula hospedadora" significa cualquier tipo de célula que es susceptible a una transformación, transfección, transducción, o similar con un construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula hospedadora" abarca cualquier descendiente de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

45 [0036] **Propiedad mejorada:** el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada a una variante que está mejorada en comparación con la progenitora. Tales propiedades mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa, una termoestabilidad mejorada.

50 [0037] **Aislado:** el término "aislado" significa una sustancia en una forma o entorno que no se da en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no esté presente de forma natural, (2) cualquier sustancia incluyendo, pero sin limitarse a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se extrae al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes de origen natural a los que está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por el ser humano con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales se asocia naturalmente (p.ej., producción recombinante en una célula hospedadora; copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; y el uso de un promotor más fuerte que el promotor asociado naturalmente con el gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación; p.ej. una célula hospedadora puede modificarse genéticamente para expresar el polipéptido de la invención. El caldo de fermentación de esa célula hospedadora comprenderá el polipéptido aislado.

60 [0038] **Condiciones de baja astringencia:** el término "condiciones de baja astringencia" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 50°C.

65

[0039] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como procesamiento en el extremo N-terminal, truncamiento en el extremo C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 20 a 397 de la SEQ ID n°: 2. Los aminoácidos 1 a 19 de la SEQ ID n°: 2 son un péptido señal. Se sabe en la técnica que una célula hospedadora puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresados por el mismo polinucleótido. El polipéptido maduro se describe en este documento como SEQ ID n°: 3.

[0040] **Secuencia codificante de polipéptido maduro:** el término "Secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de xilanas. En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es los nucleótidos 58 a 1194 de la SEQ ID n° 1. Los nucleótidos 1 a 57 de la SEQ ID n°1 codifican un péptido señal.

[0041] **Condiciones de astringencia media:** el término "Condiciones de astringencia media" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturizado, y formamida al 35%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 55°C.

[0042] **Condiciones de astringencia media-alta:** el término "condiciones de astringencia media-alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturizado, y formamida al 35%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 60°C.

[0043] **Mutante:** el término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

[0044] **Construcción de ácido nucleico:** el término "construcción de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, o bien mono o bicatenaria, que se ha aislado de un gen de origen natural o que se ha modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existiría de otro modo en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

[0045] **Operativamente enlazado:** el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control está situada en una posición apropiada respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0046] **Progenitor o glucoamilasa progenitora:** el término "progenitor" o "glucoamilasa progenitora" significa una glucoamilasa a la que se realiza una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido (de tipo salvaje) de origen natural o una variante o fragmento del mismo.

[0047] **Identidad de secuencia:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

[0048] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "longest identity" (identidad más larga) (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{(Residuos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento - Número total de espacios en alineamiento)}$$

[0049] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "longest identity" (identidad más larga) (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento - Número total de espacios en alineamiento)}$$

[0050] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante de polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de xilanasas.

5

[0051] **Variante:** El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de xilanasas que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección, en una o más (p.ej., varias) posiciones. Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la delección del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa agregar un aminoácido adyacente e inmediatamente después del aminoácido que ocupa una posición.

10

[0052] **Condiciones de astringencia muy alta:** el término "condiciones de astringencia muy alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 70°C.

15

[0053] **Condiciones de astringencia muy baja:** el término "condiciones de astringencia muy baja" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 45°C.

20

[0054] **Xilanasas de tipo salvaje:** El término xilanasas "de tipo salvaje" significa una xilanasas expresada por un microorganismo natural, como una bacteria, levadura o hongo filamentoso que se encuentra en la naturaleza.

25

Convenciones para la designación de variantes

[0055] Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N°: 3 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra xilanasas. La secuencia de aminoácidos de otra xilanasas se alinea con el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID n°: 3 y, en función del alineamiento, el número de posición del aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID n°: 3 es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización por apertura de espacio de 10, la penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLSUM62 (versión de EMBOSS de BLSUM62).

30

35

[0056] La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra xilanasas se puede determinar mediante un alineamiento de múltiples secuencias polipeptídicas usando varios programas informáticos que incluyen, pero no se limitan a, MUSCLE (comparación de múltiples secuencias por log-expectativa; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518.; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64.; Katoh y Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900), y EMBOSS EMMA empleando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), utilizando sus respectivos parámetros por defecto.

40

45

[0057] Cuando la otra enzima se ha diferenciado del polipéptido maduro descrito en la SEQ ID n°: 3, de modo que la comparación tradicional basada en secuencias no detecta su relación (Lindahl y Eloffsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencias por pares. Se puede lograr una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en las bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda de base de datos iterativo y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Incluso se puede lograr una mayor sensibilidad si la familia o la superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Programas como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructuras secundarias, perfiles de alineamiento estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neuronal que predice el plegamiento estructural para una secuencia de consulta. Del mismo modo, el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, se puede usar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilias presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos se pueden usar a su vez para generar modelos de homología para el polipéptido, y se puede evaluar la precisión de dichos modelos utilizando una variedad de herramientas desarrolladas para ese propósito.

50

55

60

65

[0058] Para proteínas de estructura conocida, están disponibles varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineaciones estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas SCOP han sido alineadas estructuralmente, y esas alineaciones son accesibles y descargables. Se pueden alinear dos o más estructuras de proteínas utilizando una variedad de algoritmos, como la matriz de alineamiento de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos se puede utilizar adicionalmente para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés con el fin de descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm y Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0059] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura que se describe a continuación se adapta para facilitar la referencia. Se emplea la abreviatura aceptada por la IUPAC de una sola letra o de tres letras de aminoácidos.

[0060] Sustituciones. Para una sustitución de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples están separadas por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", que representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

[0061] Delecciones. Para una delección de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: Aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la eliminación de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*". Las delecciones múltiples están separadas por signos de suma ("+"), p.ej., "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

[0062] Inserciones. Para una inserción de aminoácidos, se utiliza la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por consiguiente, la inserción de lisina después de glicina en la posición 195 se designa "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de múltiples aminoácidos se denomina [aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado #1, aminoácido insertado #2; etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

[0063] En tales casos, el/los residuo(s) de aminoácidos insertado(s) se numera(n) mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácidos que precede al/los residuo(s) de aminoácidos insertado(s). En el ejemplo anterior, la secuencia sería así:

Progenitor:	Variante:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

[0064] Múltiples alteraciones. Las variantes que comprenden múltiples alteraciones están separadas por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr + Gly195Glu" o "R170Y + G195E" que representan una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

[0065] Diferentes alteraciones. Cuando se pueden introducir diferentes alteraciones en una posición, las diferentes alteraciones se separan mediante una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico. Por lo tanto, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las siguientes variantes:

"Tyr167Gly + Arg170Gly", "Tyr167Gly + Arg170Ala", "Tyr167Ala + Arg170Gly", y "Tyr167Ala + Arg170Ala".

Descripción detallada de la invención

[0066] La presente invención se refiere a una variante de xilanasa, que comprende una sustitución al menos en una posición correspondiente a la posición 87 del polipéptido de la SEQ ID n°: 3, en la que la variante tiene actividad de xilanasa y tiene una tolerancia incrementada a inhibidores de xilanasa en comparación con la xilanasa de la SEQ ID n° 3; y en el que la variante tiene al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con la polipéptido de la SEQ ID n°: 3; y en donde la sustitución es H87Y.

La SEQ ID n°: 3 es el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2. Los números de posición a los que se hace referencia en este documento corresponden a los números de posición de la SEQ ID n°: 3.

Variantes

[0067] La presente invención proporciona variantes de xilanasa, que comprenden una alteración, en particular una sustitución, al menos en una posición correspondiente a la posición 87 de la SEQ ID n°: 3, y en la que la variante tiene actividad de xilanasa.

[0068] En una realización, la variante está aislada.

[0069] En una realización, la alteración es una sustitución. Más particularmente, el aminoácido presente en una posición correspondiente a la posición 87 está sustituido con Tyr (Y). En una realización, las sustituciones son H87Y.

[0070] Las variantes de xilanasa de la invención tienen propiedades mejoradas en comparación con la enzima progenitora. En particular, las variantes tienen un aumento de la tolerancia a inhibidores de xilanasa sobre la enzima progenitora. Se ha demostrado en este caso que la sustitución específica aumenta la tolerancia a inhibidores de xilanasa de la variante xilanasa en comparación con la xilanasa de la SEQ ID n°: 3.

[0071] En una realización particular, el inhibidor de xilanasa son proteínas inhibidoras, particularmente proteínas presentes en granos de cereales. En una realización, el grano de cereal es trigo.

[0072] Más particularmente, las proteínas inhibidoras se seleccionan de un grupo que comprende proteína inhibidora de la xilanasa (XIP), inhibidor de xilanasa de *T. aestivum* (TAXI) e inhibidor de xilanasa de tipo taumatina (TLXI). Los inhibidores proteicos de las xilanasas que se encuentran en cereales distintos del trigo son similares en estructura y propiedades a XIP y a TAXI del trigo y se denominan proteínas de tipo XIP y tipo TAXI. XIP comprende un grupo de proteínas homólogas codificadas por diferentes genes, entre las que XIP-I es la más abundante. De manera similar, TAXI no es una única proteína, sino que comprende dos proteínas, TAXI-I y TAXI-II. Además, los inhibidores TAXI y de tipo TAXI tienen cada uno dos isoformas que resultan del procesamiento proteolítico de la proteína madura. Se les conoce como TAXI-IA, TAXI-IB, TAXI-IIA y TAXI-IIB. Aún más particularmente, las proteínas inhibidoras se seleccionan de un grupo que comprende XIP-I, TAXI-IA, TAXI-IB, TAXI-IIA, TAXI-IIB y TLXI de trigo y sus homólogas en otros cereales.

[0073] Así, en un aspecto, la presente invención se refiere a una variante de xilanasa, que comprende al menos una sustitución en una posición correspondiente a la posición 87 del polipéptido de la SEQ ID n°: 3, en la que la variante tiene actividad de xilanasa y en la que la variante tiene al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID n°: 3, y donde que la variante tiene tolerancia aumentada a inhibidores de xilanasa.

[0074] En un aspecto, el número de alteraciones en las variantes de la presente invención es de 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones. En otro aspecto, la variante consiste en una sustitución en la posición correspondiente a la posición 87 de la SEQ ID n°: 3, particularmente 87Y.

[0075] En otro aspecto, la alteración en la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición correspondiente a la posición 87. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 87 está sustituido con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente con Tyr. En otro aspecto, la alteración variante comprende o consiste en la sustitución H87Y del polipéptido de la SEQ ID n°: 3.

[0076] Las variantes pueden comprender además una o más alteraciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) posiciones adicionales.

[0077] Cabe señalar que, para todas las variantes específicas descritas, tal variación adicional podría introducirse sin afectar significativamente a las propiedades de las variantes de xilanasa. En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención además de las sustituciones específicas mencionadas en este documento es de 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones.

[0078] Por lo tanto, el % de identidad del polipéptido variante comparado con el polipéptido progenitor de la SEQ ID n°: 3 puede ser al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos el 95%, tal como al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID n°: 3.

[0079] En una realización particular, las variantes tienen actividad de xilanasa, y comprenden la sustitución H87Y, y la variante tiene al menos el 85%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID n°: 3, y en la que la variante tiene al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, de la manera más preferible al menos el 95%, e incluso más preferiblemente al menos el 100% de la actividad xilanasa del polipéptido de la SEQ ID n°: 3 que comprende la sustitución H87Y.

[0080] En una realización particular, las variantes tienen actividad de xilanasa, y comprenden la sustitución H87Y, y la variante tiene al menos el 90%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID n°: 3, y en la que la variante tiene al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, de la manera más preferible al menos el 95%, e incluso

[0090] Los cambios en los aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, como una cola de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0091] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0092] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0093] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido pueden identificarse de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan para determinar la actividad de xilanasas para identificar residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de molécula. Véase también Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar por análisis físico de la estructura, según lo determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de los aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede inferir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

[0094] En una realización, la variante tiene una tolerancia aumentada a inhibidores de xilanasas en comparación con la enzima progenitora.

[0095] En una realización particular, la variante de xilanasas de la invención tiene un aumento en la actividad relativa de la xilanasas sobre la xilanasas de tipo salvaje de al menos un factor 7x, particularmente 8x, particularmente 8,5x, más particularmente 9x, en presencia de inhibidores de xilanasas de trigo, particularmente XIP-1, en cantidades que reducirán la actividad de la xilanasas de tipo salvaje a menos del 10%.

Xilanasas progenitoras

[0096] La xilanasas progenitora puede ser (a) un polipéptido que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de astringencia media-alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, o (ii) el complemento de longitud completa de (i); o (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1.

[0097] En un aspecto, el progenitor tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2 de al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, o el 100%, que tiene actividad de xilanasas. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere en hasta 10 aminoácidos, p.ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[0098] En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n°: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 3.

[0099] En otra realización, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 2.

[0100] En otro aspecto, el progenitor está codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de alta astringencia, o condiciones de muy alta astringencia con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n°: 1, (ii) el complemento de longitud completa de (i) (Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

[0101] El polinucleótido de la SEQ ID nº: 1 o una subsecuencia de la misma, así como el polipéptido de la SEQ ID nº: 2 o un fragmento de la misma, pueden usarse para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar el ADN que codifica un progenitor de cepas de diferentes géneros o especies según métodos ampliamente conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o el ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos de Southern blot estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían tener al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas suelen estar marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H ³⁵S, biotina o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

[0102] Una biblioteca de ADNc o ADN genómico preparada a partir de tales otras cepas puede rastrearse en busca de ADN que se hibrida con las sondas descritas anteriormente y codifica un progenitor. El ADN genómico o de otro tipo de otras cepas puede separarse mediante electroforesis en gel de agarosa o de poli(acrilamida u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede transferirse e inmovilizarse en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Con el fin de identificar un clon o ADN que se hibrida con la SEQ ID nº: 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en un Southern blot.

[0103] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida a una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a (i) la SEQ ID nº: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1; (iii) su complemento integral; o (iv) una subsecuencia de la misma; en condiciones de astringencia muy baja a muy alta. Las moléculas con las que se hibrida la sonda de ácido nucleico en estas condiciones pueden detectarse utilizando, por ejemplo, una película radiográfica o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

[0104] En otra realización, el progenitor está codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID nº: 1 de al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100%.

[0105] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido se fusiona en el extremo N o el extremo C terminal de una región de otro polipéptido.

[0106] El progenitor puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido está fusionado en el extremo N o el extremo C terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica, e incluyen la unión de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos para que estén dentro del marco y para que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del/de los mismo(s) promotor(es) y terminador. Los polipéptidos de fusión también pueden construirse usando tecnología de inteína en la que los polipéptidos de fusión se crean después de la traducción (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

[0107] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, entre otros, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381.; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512.; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0108] En un aspecto, el progenitor es una xilanasa de *Aspergillus*, por ejemplo, la xilanasa de la SEQ ID nº: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

Preparación de Variantes

[0109] Las variantes pueden prepararse utilizando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, como mutagénesis dirigida, construcción de genes sintéticos, construcción de genes semisintéticos, mutagénesis aleatoria, barajado, etc.

[0110] La mutagénesis dirigida es una técnica en la que una o más mutaciones (por ejemplo, varias) se introducen en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el progenitor.

5 [0111] La mutagénesis dirigida se puede lograr *in vitro* por PCR, lo que implica el uso de cebadores oligonucleotídicos que contienen la mutación deseada. También se puede realizar mutagénesis dirigida *in vitro* por mutagénesis de casete que conlleva la escisión por una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el progenitor y la posterior ligadura de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite que los extremos pegajosos del plásmido y el inserto se unan entre sí. Véase, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

10 [0112] La mutagénesis dirigida también se puede lograr *in vivo* mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de EE. UU. n° 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16.

15 [0113] Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida se puede usar en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que se pueden usar para preparar variantes.

20 [0114] La construcción de genes sintéticos conlleva la síntesis *in vitro* de una molécula polinucleotídica diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis de genes se puede realizar utilizando varias técnicas, como la tecnología multiplex basada en microchip descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares en las que los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

25 [0115] Se pueden realizar y probar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples utilizando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de selección relevante, como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a error, presentación de fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE. UU. n° 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

30 [0116] Los métodos de mutagénesis/barajado pueden combinarse con métodos de selección automatizada de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por las células hospedadoras (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células hospedadoras y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de los
35 residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

40 [0117] La construcción de genes semisintéticos se logra combinando aspectos de la construcción de genes sintéticos, y/o mutagénesis dirigida, y/o mutagénesis aleatoria, y/o barajado. La construcción semisintética se caracteriza por un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. Se pueden sintetizar regiones definidas de genes *de novo*, mientras que otras regiones pueden amplificarse utilizando cebadores mutagénicos específicos, mientras que otras regiones pueden someterse a una amplificación por PCR propensa a error o por PCR no propensa a error. Las subsecuencias polinucleotídicas pueden entonces barajarse.

45 Polinucleótidos

[0118] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican una variante de la presente invención.

50 Construcciones de ácido nucleico

[0119] La presente invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia de codificación en una célula hospedadora adecuada en
55 condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0120] El polinucleótido puede manipularse de diversas maneras para proporcionar la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son
60 ampliamente conocidas en la técnica.

[0121] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula hospedadora para la expresión del polinucleótido. El promotor contiene secuencias de control transcripcional que median la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora, incluidos los promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede
65

obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sea homólogos o heterólogos a la célula hospedadora.

[0122] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula hospedadora bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de penicilinas (*PenP*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), el operón *lac* de *E. Coli*, el promotor *trc* de *E. coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), el gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, y el gen de betalactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al. 1989, supra. Ejemplos de promotores en tándem se describen en WO 99/43835.

[0123] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula hospedadora fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable al ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglicosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitantes incluyen promotores modificados de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0124] En un hospedador de levadura, se obtienen promotores útiles de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactoquinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células hospedadoras de levadura están descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0125] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que es reconocido por una célula hospedadora para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está unida operativamente al extremo 3' terminal del polinucleótido que codifica la variante. Se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula hospedadora.

[0126] Los terminadores preferidos para células hospedadoras bacterianas se obtienen de los genes para proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus clausii*, alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, y ARN ribosómico (*rrnB*) de *Escherichia coli*.

[0127] Los terminadores preferidos para células hospedadoras fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0128] Los terminadores preferidos para células hospedadoras de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células hospedadoras de levadura son descritos por Romanos et al. 1992, supra.

[0129] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm en dirección hacia 3' respecto de un promotor y en dirección hacia 5' de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0130] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

- 5 [0131] La secuencia de control también puede ser una líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula hospedadora. La secuencia líder está unida operativamente al extremo 5' del polinucleótido que codifica la variante. Se puede usar cualquier líder que sea funcional en la célula hospedadora.
- [0132] Los líderes preferidos para las células hospedadoras fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- 10 [0133] Los líderes adecuados para células hospedadoras de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 15 [0134] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' terminal de la secuencia codificante de la variante y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula hospedadora como una señal para agregar residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula hospedadora.
- 20 [0135] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células hospedadoras fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- 25 [0136] Secuencias de poliadenilación útiles para células hospedadoras de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, Mol. Biol. celular. 15: 5983-5990.
- [0137] La secuencia de control también puede ser una región de codificación de péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al extremo N terminal de una variante y dirige la variante a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia de codificación del polinucleótido puede contener inherentemente una secuencia de codificación de péptido señal enlazada naturalmente en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia de codificación que codifica la variante. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia de codificación puede contener una secuencia de codificación de péptido señal que es ajena a la secuencia de codificación. Puede requerirse una secuencia de codificación de péptido señal extraña cuando la secuencia de codificación no contiene naturalmente una secuencia de codificación de péptido señal. Alternativamente, una secuencia de codificación de péptido señal extraña puede simplemente reemplazar la secuencia de codificación de péptido señal natural para aumentar la secreción de la variante. Sin embargo, se puede usar cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirija la variante expresada hacia la vía secretora de una célula hospedadora.
- 30 [0138] Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células hospedadoras bacterianas son las secuencias codificantes de péptidos señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, betalactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus*, y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiology Reviews 57: 109-137.
- 40 [0139] Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células hospedadoras fúngicas filamentosas son las secuencias codificadoras de péptidos señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.
- 50 [0140] Los péptidos señal útiles para células hospedadoras de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptidos señal útiles están descritas por Romanos et al. 1992, supra.
- 55 [0141] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de un propéptido que codifica un propéptido situado en el extremo N terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 60 [0142] Cuando las secuencias tanto del péptido señal como del propéptido están presentes, la secuencia del propéptido se coloca junto al extremo N terminal de la variante y la secuencia del péptido de señal se coloca junto al extremo N terminal de la secuencia del propéptido.
- 65

[0143] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante en relación con el crecimiento de la célula hospedadora. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en los sistemas procarióticos incluyen los sistemas de operones *lac*, *tac* y *trp*. En el caso de levaduras, se puede utilizar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En los hongos filamentosos, se pueden usar el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten la amplificación de genes. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante estaría unido operativamente con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0144] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las diversas secuencias de nucleótidos y control pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica la variante en dichos sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse insertando el polinucleótido o una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector de modo que la secuencia codificante esté unida operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0145] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

[0146] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede usar un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que, juntos, contienen el ADN total que se introducirá en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón.

[0147] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o resistencia viral, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.

[0148] Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia a los antibióticos como ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomina o resistencia a la tetraciclina. Los marcadores adecuados para células hospedadoras de levadura incluyen, pero no se limitan a, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula hospedadora fúngica filamentosa incluyen, entre otros, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), así como sus equivalentes. Para su uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0149] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula hospedadora o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0150] Para la integración en el genoma de la célula hospedadora, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula hospedadora en una(s) ubicación(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, como de 100 a 10000 pares de bases, de 400 a 10000 pares de bases y de 800 a 10000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de la secuencia con la secuencia deseada correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia deseada en el genoma de la célula hospedadora. Además, los elementos de integración pueden ser

polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora mediante recombinación no homóloga.

5 [0151] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula hospedadora en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

10 [0152] Ejemplos de orígenes de replicación bacterianos son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1, que permiten la replicación en *Bacillus*.

15 [0153] Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula hospedadora de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

20 [0154] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67.; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede lograr de acuerdo con los métodos descritos en WO 00/24883.

25 [0155] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención puede insertarse en una célula hospedadora para aumentar la producción de una variante. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula hospedadora o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido, donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

30 [0156] Los procedimientos utilizados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook). et al., 1989, supra).

Células hospedadoras

35 [0157] La presente invención también se refiere a células hospedadoras recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Una construcción o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula hospedadora para que la construcción o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula hospedadora" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no sea idéntica a la célula progenitora debido a las mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula hospedadora dependerá en gran medida del gen que codifique la variante y su fuente.

45 [0158] La célula hospedadora puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

50 [0159] La célula hospedadora procariota puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.

55 [0160] La célula hospedadora bacteriana puede ser cualquiera célula de *Bacillus* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmas*, *Bacillus Lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.

60 [0161] La célula hospedadora bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

65 [0162] La célula hospedadora bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0163] La introducción de ADN en una célula de bacillus puede efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede efectuarse por transformación de protoplastos, electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede efectuarse por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Métodos 64: 391-397), o conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Reinar. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede ser efectuada por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Reinar. Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula hospedadora.

[0164] La célula hospedadora también puede ser una eucariota, como una célula de un mamífero, un insecto, una planta o un hongo.

[0165] La célula hospedadora puede ser una célula fúngica. "Hongos", como se usa en el presente documento, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota, así como Oomycota y todos los hongos mitospóricos (como los define Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

[0166] La célula hospedadora fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se usa en este documento incluye las levaduras ascospóricas (Endomycetales), las levaduras basidiospóricas y las levaduras pertenecientes a los hongos imperfectos (Blastomycetes). Dado que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, las levaduras se definirán como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore and Davenport, editors, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0167] La célula hospedadora de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

[0168] La célula hospedadora fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como los define Hawksworth). et al. 1995, supra). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación de hifas y el catabolismo del carbono es necesariamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo por levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* es por brote de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

[0169] La célula hospedadora fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0170] Por ejemplo, la célula hospedadora fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermiformis*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia*

terrestris, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0171] Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que involucra la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida de por sí. Procedimientos adecuados para la transformación de células hospedadoras de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 81: 1470-1474 y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* se describen en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156y WO 96/00787. La levadura puede transformarse utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 75: 1920.

Métodos de producción

[0172] La presente invención también se refiere a métodos para producir una variante, que comprenden: (a) cultivar una célula hospedadora recombinante de la presente invención en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

[0173] Las células hospedadoras se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz agitado, o fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lote, por lote alimentado o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan expresar y/o aislar la variante. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (por ejemplo, en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no se secreta, se puede recuperar de lisados celulares.

[0174] La variante puede detectarse utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes. Estos métodos de detección incluyen, entre otros, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, puede usarse un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante.

[0175] La variante puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, entre otros, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0176] La variante se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

[0177] En un aspecto alternativo, la variante no se recupera, sino que se utiliza como fuente de la variante una célula hospedadora de la presente invención que expresa la variante. Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una formulación de caldo completo o cultivo de células, que comprende la variante de la invención.

Composiciones

[0178] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden una variante de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en tal variante. El término "enriquecido" significa que la actividad de xilanasas de la composición se ha incrementado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de 1,1.

[0179] La composición puede comprender una variante como el principal componente enzimático, por ejemplo, una composición mono-componente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como una alfa-galactosidasa, alfa-glucosidasa, aminopeptidasa, alfa-amilasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, beta-xilosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, mylchym, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, glucoamilasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, u otra xilanasas.

[0180] En una realización particular, la composición comprende la xilanasa de la invención y una alfa-amilasa. Se prefieren las alfa-amilasas bacterianas, que normalmente son estables a las temperaturas utilizadas durante la licuefacción. En una realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de *Bacillus stearothermophilus*. La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* puede ser una de tipo salvaje madura o una variante madura de la misma. Las alfa-amilasas maduras de *Bacillus stearothermophilus* se pueden truncar naturalmente durante la producción recombinante. Por ejemplo, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* se puede truncar de manera que tenga alrededor de 491 aminoácidos (en comparación con la SEQ ID n°: 3 de WO 99/19467. Se prefieren las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una doble delección correspondiente a una delección de las posiciones 181 y 182 y además comprenden una sustitución N193F (también denominada I181*+G182*+N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje de la SEQ ID n°: 3 descrita en WO 99/19467. La alfa-amilasa bacteriana también puede tener una sustitución en una posición correspondiente a S239 en la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEQ ID N°: 4 de WO 99/19467, o una variante S242 de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de la SEQ ID N°: 3 en WO 99/19467. En una realización preferida, la alfa-amilasa se selecciona del grupo de variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*:

I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E;
 I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
 I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+Q254S+M284V; y
 I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando la SEQ ID n°: 3 descrita en WO 99/19467 para la numeración).

[0181] En otra realización particular, la composición comprende la xilanasa de la invención, una alfa amilasa y una proteasa termoestable. En una realización preferida, la proteasa termoestable es una variante de la metaloproteasa descrita como la parte madura de la SEQ ID n°: 2 descrita en WO 2003/048353 o la parte madura de la SEQ ID n°: 1 en WO 2010/008841 con las siguientes mutaciones:

D79L+S87P+A112P+D142L;
 D79L+S87P+D142L; o
 A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L.

[0182] En otra realización, la proteasa termoestable se deriva de una cepa de la bacteria *Pirococcus*, como una cepa de *Pyrococcus furiosus* (proteasa pfu)

[0183] En una realización, la proteasa es la que se muestra como SEQ ID n°: 1 la patente de EE. UU. 6,358,726-B1.

[0184] En otra realización particular, la composición comprende la xilanasa de la invención, una alfa amilasa, una proteasa termoestable y una glucoamilasa termoestable. En una realización específica, la glucoamilasa termoestable es de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum*, en particular la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* divulgada como la SEQ ID n°: 2 de WO 2011/127802. En una realización preferida, la glucoamilasa es una variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEQ ID n°: 2 en WO 2011/127802 con una sustitución K79V y descrita en WO 2013/036526.

[0185] Las composiciones pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de granulado o microgranulado. La variante puede estabilizarse de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

[0186] A continuación se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de la invención. La dosificación de la composición de la invención y otras condiciones en las que se usa la composición se pueden determinar sobre la base de métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0187] Una variante de la presente invención se puede usar en varias aplicaciones para degradar o convertir un material que contiene xilano que comprenden tratar el material con la variante (véase, por ejemplo, WO 2002/18561). En consecuencia, la presente invención también se refiere a métodos para degradar un material que contiene xilano, que comprenden tratar el material que contiene xilano con un polipéptido de este tipo que tiene actividad de xilanasa. La dosificación de los polipéptidos de la presente invención y otras condiciones en las que se usa la preparación pueden determinarse sobre la base de métodos conocidos en la técnica.

[0188] Un uso preferido de la variante de la invención es para la reducción de la viscosidad en un proceso para licuar un material que contiene almidón. Las fuentes del material que contiene almidón pueden seleccionarse de granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, yuca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, frijoles y batatas, o mezclas de los mismos, o cereales, o materias primas que contienen azúcar, como melazas, frutas, caña de azúcar o remolacha azucarera, patatas.

[0189] La licuefacción se realiza en presencia de al menos una alfa amilasa y la variante de xilanasas de la invención. La licuefacción puede ir seguida de sacarificación y, opcionalmente, de fermentación para generar un producto de fermentación, preferiblemente etanol.

5

[0190] En un aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende las etapas de: (a) licuar material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa; (b) sacarificar el material licuado; y (c) fermentar con un organismo fermentador; donde la variante de xilanasas de la invención está presente durante la etapa (a).

10

[0191] La sacarificación y la fermentación se pueden realizar simultáneamente. El producto de fermentación es preferiblemente alcohol, más preferiblemente etanol.

15

[0192] En otra realización, la invención se refiere a un proceso para producir un producto de jarabe a partir de material que contiene almidón, que comprende la etapa de: (a) mezclar el material que contiene almidón seco con agua para formar una pulpa, (b) licuar material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa; (c) sacarificar el material licuado en presencia de una glucoamilasa, donde la variante de xilanasas de la invención está presente durante la etapa (a) y/o (b).

20

[0193] El material que contiene almidón se selecciona preferiblemente de entre los cereales, es decir, pastos cuyas semillas se utilizan como alimento. En una realización particular, el material que contiene almidón se selecciona de trigo o cebada. Más particularmente, es trigo.

25

[0194] Las variantes de la presente invención también se pueden usar en la degradación de la biomasa lignocelulósica o la conversión a azúcares fermentables para la producción de, por ejemplo, combustibles, etanol potable y/o productos de fermentación (por ejemplo, ácidos, alcoholes, cetonas, gases, y similares). Las variantes se usan preferiblemente en combinación con otras enzimas que degradan el xilano y una composición de celulasa (endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s) y beta-glucosidasa(s)).

30

[0195] En otra realización, la invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, que comprende:

35

- (a) sacarificación de un material celulósico o que contiene xilano con una composición enzimática en presencia del polipéptido que tiene actividad de xilanasas de la invención;
- (b) fermentar el material celulósico sacarificado o que contiene xilano con uno o más microorganismos de fermentación para producir el producto de fermentación; y
- (c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.

40

[0196] En un aspecto, la composición comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa y una beta-glucosidasa.

Plantas

45

[0197] La presente invención también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta, parte de planta o célula vegetal transgénica, que comprende un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir la variante en cantidades recuperables. La variante puede ser recuperada de la planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o la parte de planta que contiene la variante se puede usar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

50

[0198] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (dicot) o monocotiledónea (monocot). Algunos ejemplos de plantas monocotiledóneas son las gramíneas, como la espiguilla (pasto azul de Kentucky, Poa), hierba forrajera como la Festuca, Lolium, pasto templado, como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

55

[0199] También se incluyen dentro del alcance de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de plantas y células vegetales.

60

[0200] La planta transgénica o célula vegetal que expresa una variante puede construirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o la célula vegetal se construye incorporando una o más construcciones de expresión que codifican una variante en el genoma de la planta hospedadora o el genoma del cloroplasto y propagando la planta modificada o la célula vegetal resultante en una planta o célula transgénica.

65

[0201] La construcción de expresión es convenientemente una construcción de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica una variante operativamente unida con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de planta elegida. Además, la construcción de expresión

puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células vegetales en las que se ha integrado la construcción de expresión y las secuencias de ADN necesarias para la introducción de la construcción en la planta en cuestión (esto último depende del método de introducción de ADN que se utilice).

5 [0202] La elección de las secuencias reguladoras, como las secuencias promotora y terminadora y, opcionalmente, las secuencias de señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, en función de cuándo, dónde y cómo se desea expresar la variante. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica una variante puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica para el desarrollo, el estadio o el tejido, y el producto génico puede dirigirse a un tejido específico o parte concreta de una planta, como las semillas o las hojas. Las secuencias reguladoras están, por
10 ejemplo, descritas por Tague et al., 1988, Plant Physiology 86: 506.

[0203] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado la construcción de expresión se seleccionan y regeneran en plantas completas de acuerdo con métodos ampliamente conocidos en la técnica. A menudo, el procedimiento de transformación está diseñado para la eliminación selectiva de los genes de selección durante la regeneración o en las siguientes generaciones utilizando, por ejemplo, la cotransformación con dos construcciones de ADN-T separadas o la escisión específica del sitio del gen de selección por una recombinasa específica.
15

[0204] La presente invención también se refiere a métodos para producir una variante de la presente invención que comprende: (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica la variante en condiciones propicias para la producción de la variante; y (b) recuperar la variante.
20

[0205] La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

25 EJEMPLOS

Cepa

[0206] La cepa de *Aspergillus oryzae* MT3568 según se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N°: US20110111453 se utilizó como un hospedador de expresión para la xilanasa GH10A de *Aspergillus fumigatus* y sus variantes.
30

Medios y reactivos

[0207] La solución de metales traza AMG estaba compuesta por 14,3 g de ZnSO₄· 7H₂O, 2,5 g de CuSO₄· 5H₂O, 0,5 g de NiCl₂· 6H₂O, 13,8 g de FeSO₄· 7H₂O, 8,5 g de MnSO₄· H₂O, 3 g de ácido cítrico, y agua desionizada a 1 litro.
35

[0208] El medio MDU2BP (pH 5,0) estaba compuesto por 135 g de maltosa, 3 g de MgSO₄· 7H₂O, 3 g de NaCl, 6 g de K₂SO₄, 36 g de KH₂PO₄, 21 g de extracto de levadura, 6 g de urea, 1,5 ml de solución de metales traza AMG y agua desionizada hasta 1 litro.
40

[0209] La solución de PEG estaba compuesta por 6 g de polietilenglicol 4000 (PEG 4000), 100 µl de Tris 1M pH 7,5, 100 µl de CaCl₂ 1 M, y agua desionizada hasta 10 ml.
45

[0210] Las placas de agar 2XYT estaban compuestas por 16 g de triptona, 10 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, 15 g de agar Bacto y agua desionizada hasta 1 litro.

[0211] Las placas de agar 2XYT+Amp estaban compuestas de agar 2XYT suplementado con 100 µg de ampicilina por ml.
50

Ejemplo 1

Construcción de variantes de xilanasa GH10 de *Aspergillus fumigatus*

55 [0212] Se construyeron variantes de xilanasa GH10 de *Aspergillus fumigatus* (SEQ ID n°: 1) realizando una única reacción de mutagénesis dirigida en pHyGe001 como se describe en la patente de EE. UU. n° 7,960,160) utilizando un kit de mutagénesis dirigida QUIKCHANGE® II XL (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.). Se diseñaron dos cebadores mutagénicos para insertar la mutación deseada. La PCR estaba compuesta por 12,5 ng de cada cebador, aproximadamente 10 ng de plásmido molde, tampón de reacción 1X QUIKCHANGE® (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.), 1 µl de la mezcla de QUIKCHANGE® II XL dNTP (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.), y 1 µl de 2,5 U/µl Pfu de Enzima ULTRA™ (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) en un volumen final de 50 µl. La reacción de amplificación se realizó utilizando un termociclador MASTERCYCLER® de EPPENDORF® (Eppendorf, Hauppauge, NY, EE. UU.) programado para un arranque en caliente a 95 °C; 1 ciclo a 95 °C durante 30 segundos; 60 16 ciclos cada uno a 95 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 1 minuto y 68 °C durante 9 minutos; y una retención de 4 °C. Un microlitro de Dpn I se añadió directamente a la reacción de amplificación y se incubó a 37 °C durante
65

1 hora. Un volumen de 2 µl de la la reacción digerida por Dpn I se utilizó para transformar células ultracompetentes de *E. Coli* ONE SHOT® TOP10 (Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los transformantes de *E. Coli* se seleccionaron en placas de agar 2XYT+Amp. El ADN plasmídico de varios de los transformantes de *E. Coli* resultantes se preparó utilizando un BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.). El inserto se confirmó mediante secuenciación de ADN utilizando un analizador genético modelo 3130xL (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, EE. UU.) y química de terminador marcado por tinción de un kit de secuenciación de ciclo BIGDYE® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Para cada reacción, se eligió uno de los clones con la mutación deseada. Los cebadores utilizados en la reacción para generar una variante de *Aspergillus fumigatus* específica con la mutación con la mutación H87Y se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Plásmido	Mutación	Plásmido Progenitor	Oligo ID #	Secuencia cebadora
pMaWo142-24	H87Y	pHyGe001	1200245	CGATGCCATACTCTGGTCTGGTACA GTCAGCTACCGAACTGGGGT (SEQ ID NO: 5)
			1200246	ACCCAGTTCGGTAGCTGACTGTA CCAGACCAGAGTATGGCATCG (SEQ ID NO: 6)

Ejemplo 2:

Expresión de las variantes de xilanasas GH10 de *Aspergillus fumigatus* en *Aspergillus oryzae* MT3568

[0213] Se prepararon protoplastos de *Aspergillus oryzae* MT3568 de acuerdo con el método de Christensen et al., 1988, *Bio/Technology* 6: 1419-1422, y se transformaron con 5 µg de cada uno de los vectores de expresión. Las transformaciones produjeron aproximadamente 1-10 transformantes para cada vector. Se aislaron hasta cuatro transformantes para cada transformación en placas de APD individuales.

[0214] Las placas de APD confluentes de los transformantes se lavaron con 8 ml de TWEEN® 20 al 0,01% y se inocularon por separado en 1 ml de medio MDU2BP en placas de cultivo de tejidos estériles de 24 pocillos y se incubaron a 34 °C. Cuatro días después de la incubación, se analizaron 20 µl del caldo recolectado de cada cultivo utilizando geles de Tris-Glicina SDS-PAGE al 8-16% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los perfiles de SDS-PAGE de los cultivos mostraron que varios transformantes tenían una nueva banda principal de aproximadamente 45 kDa.

[0215] Una placa confluyente de un transformante para cada transformación (cultivada en APD) se lavó con 8 ml de TWEEN® 20 al 0,01% y se inoculó en 125 ml de matraces de vidrio con deflectores que contenían 25 ml de medio MDU2BP y se incubó a 34°C con agitación a 225 rpm para generar caldos para la caracterización de las variantes. Los matraces se recogieron el día 4 y se filtraron utilizando una membrana GP Express plus de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.).

Ejemplo 3:

Termoactividad de las xilanasas GH10 de *Aspergillus aculeatus* y *Aspergillus fumigatus*

[0216] La xilanasas GH10 de *Aspergillus fumigatus* se expresó a partir de *Aspergillus oryzae* MT5668 como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. US20110111453. La xilanasas de *Aspergillus aculeatus* probada en este caso es un producto comercial llamado Shearzyme 500 de Novozymes (SEQ ID n°: 4). Se analizó la actividad de ambas enzimas en arabinoxilano de trigo a temperaturas que oscilaban entre los 70 y 92 °C, como se describe a continuación.

[0217] El sustrato se preparó humedeciendo primero 0,5 g de arabinoxilano de trigo de viscosidad media (Megazyme, Produce Code PWAXYM) con 4 ml de etanol en un vaso de precipitados y luego agregando 50 ml de citrato de sodio 100 mM, pH 5,0. El sustrato se agitó con calentamiento suave en una placa caliente hasta que el sustrato se disolvió completamente. Se preparó una solución DNS mediante la adición de 20 g de NaOH, 4 g de fenol y 1 g de metabisulfito de sodio a 900 ml de agua en una campana extractora. Se diluyeron muestras a una concentración de proteína xilanasas final aproximada de 1 µg/ml en tampón de citrato en un tubo de ensayo de vidrio.

[0218] Se transfirieron 50 µl de cada enzima diluida a todos los pocillos en tres filas sucesivas en una placa de PCR de 96 pocillos. Se agregaron 50 µL de soluciones estándar de xilosa de 20, 10, 5, 2,5, 1,2 y 0,6 mM, compuestas en tampón de citrato, a los pocillos 1 a 6 de la fila A y se agregaron 50 µL de tampón de citrato a los pocillos 7 a 12 de la fila A de la placa de PCR. Se agregaron 50 µL de sustrato a todos los pocillos y la placa de PCR se transfirió a un termociclador programado para un gradiente de temperatura de 70-92 °C y se incubó durante 1 h. Se agregaron 80 µL de DNS a cada pocillo y la placa se incubó a 95 °C durante 5 min. La placa se centrifugó luego a 1000 xg durante 1 min. Se transfirieron 130 µl de cada pocillo al pocillo correspondiente en una placa de microtitulación y se midió la absorbancia a 560 nm. La pendiente (m) y la intersección de y (b) de la absorbancia frente a los datos de concentración de xilosa se analizaron mediante regresión lineal utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica. La concentración de xilosa en cada pocillo de muestra se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$[xilosa (mM)] = \frac{Absorbancia (muestra) - b}{m}$$

La actividad de xilanasa se calculó luego en µmol de equivalentes de xilosa producidos por minuto usando la siguiente ecuación:

$$Actividad\ de\ xilanasa \left(\frac{\mu mol}{min} \right) = xilosa \left(\frac{mmol}{L} \right) \times \frac{1000 \mu mol}{mmol} \times 50 \mu L \times \frac{1 L}{10^6 \mu L} \times \frac{1}{60 min}$$

Los valores relativos de la actividad enzimática se calcularon dividiendo la actividad de xilanasa a cada temperatura por la actividad máxima de la xilanasa medida para cada enzima. Estos valores se muestran representados en función de la temperatura en la Figura 1. La actividad más alta de AacuGH10 se midió a 70 °C, mientras que la actividad más alta de AfumGH10 se midió a 76 °C. Estos resultados demuestran que la xilanasa de *Aspergillus fumigatus* es más activa a temperaturas más altas que la xilanasa de *Aspergillus aculeatus*.

Ejemplo 4:

Producción de inhibidores

[0219] Se extrajeron inhibidores proteicos de harina de trigo utilizando un método adaptado de McLauchlan et al. (A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. (1999), Biochem. J., 338: 441-446). Brevemente, se suspendieron 10 g de harina de trigo en 50 g de agua destilada, desionizada y se mezclaron a temperatura ambiente durante 30 min. Durante este paso, los inhibidores proteicos se disuelven, mientras que las fibras insolubles, como el xilano y la celulosa, y el almidón permanecen en gran parte insolubles. La suspensión se filtró luego bajo vacío para separar los componentes insolubles residuales de la harina de trigo de los inhibidores proteicos en el filtrado. El filtrado se recogió y se lavó con 3 volúmenes de citrato de sodio 50 mM, pH 5,0 utilizando columnas de centrifugación Vivaspin 20 con 5000 MWCO (VIVA products, n° de catálogo 28-9323-59). El concentrado se usó para ensayos de inhibición posteriores. Nótese que el procedimiento utilizado en este caso no separa las diferentes clases de inhibidores de trigo (XIP1, TAXI, etc.).

Ejemplo 5:

Sensibilidad de las xilanasas GH10 de *Aspergillus aculeatus* y *Aspergillus fumigatus* a los inhibidores derivados del trigo

[0220] Se prepararon cinco diluciones en serie a 1/2 de la preparación de inhibidor de trigo del Ejemplo 4 en tubos de ensayo combinando 2 ml de filtrado de trigo (o dilución previa) y 2 ml de tampón de citrato. La preparación del inhibidor y sus diluciones en serie se transfirieron a las filas B a G de una placa de PCR como se muestra a continuación.

[0221] Disposición en la placa de inhibidores de trigo y enzimas. Las diluciones 1-6 se refieren a diluciones crecientes (concentraciones relativas más bajas) de los inhibidores de trigo.

	1	2	3	4	5	6
A						
B	Muestra1 Dil. 1	Muestra1 Dil. 1	Muestra1 Dil. 1	Muestra2 Dil. 1	Muestra2 Dil. 1	Muestra2 Dil. 1
C	Muestra1 Dil. 2	Muestra1 Dil. 2	Muestra1 Dil. 2	Muestra2 Dil. 2	Muestra2 Dil. 2	Muestra2 Dil. 2

D	Muestra1 Dil. 3	Muestra1 Dil. 3	Muestra1 Dil. 3	Muestra2 Dil. 3	Muestra2 Dil. 3	Muestra2 Dil. 3
E	Muestra1 Dil. 4	Muestra1 Dil. 4	Muestra1 Dil. 4	Muestra2 Dil. 4	Muestra2 Dil. 4	Muestra2 Dil. 4
F	Muestra1 Dil. 5	Muestra1 Dil. 5	Muestra1 Dil. 5	Muestra2 Dil. 5	Muestra2 Dil. 5	Muestra2 Dil. 5
G	Muestra1 Dil. 6	Muestra1 Dil. 6	Muestra1 Dil. 6	Muestra2 Dil. 6	Muestra2 Dil. 6	Muestra2 Dil. 6
H	Muestra1 Blanco	Muestra1 Blanco	Muestra1 Blanco	Muestra2 Blanco	Muestra2 Blanco	Muestra2 Blanco

[0222] Se transfirieron 50 µL de tampón de citrato a la fila H. Se agregaron 50 µl de cada enzima diluida según el Ejemplo 1 a las filas B a H en tres columnas consecutivas en la placa de PCR y la placa de PCR se incubó en un termociclador a 50 °C durante 30 min. Las concentraciones relativas de inhibidor después de la adición de enzima en las filas B a G fueron 0,500, 0,250, 0,125, 0,0625, 0,03125 y 0,01563. Luego se transfirieron 50 µL de cada pocillo a una nueva placa de PCR y se midió la actividad de xilanasas en cada pocillo a 50 °C, como se describe en el Ejemplo 3.

[0223] La actividad de xilanasas aparente representada en función de la concentración relativa del inhibidor se muestra en la Figura 2 para concentraciones relativas del inhibidor menores o iguales a 0,250. Los cambios en la liberación de xilosa medidos tras la incubación de la xilanasas GH10 de *Aspergillus aculeatus* con concentraciones crecientes de inhibidores de trigo fue insignificante, lo que indica que es tolerante a los inhibidores derivados del trigo, como se había dicho anteriormente (Flatman et al., Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein XIP-I from wheat. *Biochem. J.* (2002); 365: 773-781; Juge, N. et al., XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function. *Biochem Biophys Acta*, (2003), 1696: 203-211; Gebruers, K. et al., Properties of TAXI-type endoxylanase inhibitors. *Biochem Biophys Acta*, (2003), 1696: 213-221; Goesart et al., Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals. *Biochem Biophys Acta*, (2003), 1696: 193-202). En contraste, la actividad de la xilanasas GH10 de *Aspergillus fumigatus* disminuyó notablemente al aumentar las concentraciones de inhibidores del trigo, lo que indica que estaba fuertemente inhibida.

Ejemplo 6:

Análisis de la sensibilidad y la termoactividad del inhibidor de la variante de xilanasas GH10 de *Aspergillus fumigatus*

[0224] Se testaron variantes de la GH10 de *Aspergillus fumigatus* y de tipo salvaje en el ensayo de inhibidores descrito en el Ejemplo 5. La variante H87Y fue marcadamente más tolerante a los inhibidores que la de tipo salvaje y fue similar en este aspecto a la GH10 de *Aspergillus aculeatus* (Figura 3).

[0225] La variante de xilanasas GH10 (H87Y) de *Aspergillus fumigatus* también se probó en el ensayo de termoactividad descrito en el Ejemplo 4. En este caso, Optimash TBG, un producto de procesamiento de grano a alta temperatura de DuPont también se incluyó como referencia. Además, tanto la variante de xilanasas GH10 de *Aspergillus fumigatus* como la de tipo salvaje tienen mayor termoactividad que las xilanasas en Optimash TBG (Figura 4).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0226]

<110> Novozymes A/S

<120> Variantes de xilanasas y polinucleótidos que las codifican

<130> 12791-WO-PCT

<160> 6

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 1194

<212> ADN

<213> *Aspergillus fumigatus*

ES 2 712 402 T3

<400> 1
 atgggtccatc tatcttcatt ggcagcagcc ctggctgctc tgcctcttgt atatggagct 60
 ggcctgaaca cagcagccaa agccaaagga ctaaagtact ttggttccgc cacggacaat 120
 5 ccagagctca cggactctgc gtatgtcgcg caactgagca acaccgatga ttttggtcaa 180
 atcacacccg gaaactccat gaagtgggat gccaccgagc cttctcagaa ttctttttcg 240
 10 ttcgcaaatg gagacgccgt ggtcaatctg gcgaacaaga atggccagct gatgctgatgc 300
 catactctgg tctggcacag tcagctaccg aactgggtct ctagcgggtc atggaccaat 360
 gcgacccttt tggcggccat gaagaatcat atcaccaatg tggttactca ctacaagggg 420
 15 aagtgctacg cctgggatgt tgtcaatgaa gccctgaacg aggacggtac tttccgtaac 480
 tctgtcttct accagatcat cggcccagca tacattccta ttgcgttcgc cacggctgct 540
 20 gccgcagatc ccgacgtgaa actctactac aacgactaca acattgaata ctcaggcgcc 600
 aaagcgactg ctgctcagaa tatcgtcaag atgatcaagg cctacggcgc gaagatcgac 660
 ggcgtcggcc tccaggcaca ctttatcgtc ggcagcactc cgagtcaatc ggatctgacg 720
 25 accgtcttga agggctacac tgctctcggc gttgaggtgg cctataccga acttgacatc 780
 cgcatgcagc tgcctctgac cgccgcaaag ctggcccagc agtccactga cttccaaggc 840
 30 gtggcccgag catgcttag caccactggc tgcgtgggtg tcactatctg ggactggacc 900
 gacaagtact cctgggtccc cagcgtgttc caaggctacg gcgccccatt gccttgggat 960
 gagaactatg tgaagaagcc agcgtacgat ggctgatgg cgggtcttgg agcaagcggc 1020
 35 tccggcacca caacgaccac tactactact tctactacga caggaggtac ggaccctact 1080
 ggagtcgctc agaaatgggg acagtgtggc ggtattggct ggaccgggccc aacaacttgt 1140
 40 gtcagtggta ccacttgcca aaagctgaat gactggtact cacagtgcct gtaa 1194

<210> 2
 <211> 397
 45 <212> PRT
 <213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 2
 50 Met Val His Leu Ser Ser Leu Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 55 Val Tyr Gly Ala Gly Leu Asn Thr Ala Ala Lys Ala Lys Gly Leu Lys
 20 25 30

ES 2 712 402 T3

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

ES 2 712 402 T3

			260					265						270			
5	Gln	Gln	Ser	Thr	Asp	Phe	Gln	Gly	Val	Ala	Ala	Ala	Cys	Val	Ser	Thr	
			275					280					285				
10	Thr	Gly	Cys	Val	Gly	Val	Thr	Ile	Trp	Asp	Trp	Thr	Asp	Lys	Tyr	Ser	
		290					295					300					
15	Trp	Val	Pro	Ser	Val	Phe	Gln	Gly	Tyr	Gly	Ala	Pro	Leu	Pro	Trp	Asp	
	305					310					315					320	
20	Glu	Asn	Tyr	Val	Lys	Lys	Pro	Ala	Tyr	Asp	Gly	Leu	Met	Ala	Gly	Leu	
					325					330					335		
25	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Asp	Pro	Thr	Gly	Val	Ala	Gln	Lys	Trp	Gly	Gln	
			355					360					365				
30	Cys	Gly	Gly	Ile	Gly	Trp	Thr	Gly	Pro	Thr	Thr	Cys	Val	Ser	Gly	Thr	
		370					375					380					
35	Thr	Cys	Gln	Lys	Leu	Asn	Asp	Trp	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu				
	385					390					395						
40	<210>	3															
	<211>	378															
	<212>	PRT															
	<213>	<i>Aspergillus fumigatus</i>															
45	Ala	Gly	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Lys	Ala	Lys	Gly	Leu	Lys	Tyr	Phe	Gly	
	1			5						10					15		
50	Ser	Ala	Thr	Asp	Asn	Pro	Glu	Leu	Thr	Asp	Ser	Ala	Tyr	Val	Ala	Gln	
			20						25					30			
55	Leu	Ser	Asn	Thr	Asp	Asp	Phe	Gly	Gln	Ile	Thr	Pro	Gly	Asn	Ser	Met	
			35					40					45				
60	Lys	Trp	Asp	Ala	Thr	Glu	Pro	Ser	Gln	Asn	Ser	Phe	Ser	Phe	Ala	Asn	
	50						55					60					

ES 2 712 402 T3

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

ES 2 712 402 T3

Ser Val Phe Gln Gly Tyr Gly Ala Pro Leu Pro Trp Asp Glu Asn Tyr
 290 295 300

5 Val Lys Lys Pro Ala Tyr Asp Gly Leu Met Ala Gly Leu Gly Ala Ser
 305 310 315 320

10 Gly Ser Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Thr Gly
 325 330 335

15 Gly Thr Asp Pro Thr Gly Val Ala Gln Lys Trp Gly Gln Cys Gly Gly
 340 345 350

20 Ile Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys Val Ser Gly Thr Thr Cys Gln
 355 360 365

Lys Leu Asn Asp Trp Tyr Ser Gln Cys Leu
 370 375

25 <210> 4
 <211> 406
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus aculeatus*

30 <400> 4

Met Val Gly Leu Leu Ser Ile Thr Ala Ala Leu Ala Ala Thr Val Leu
 1 5 10 15

35 Pro Asn Ile Val Ser Ala Val Gly Leu Asp Gln Ala Ala Val Ala Lys
 20 25 30

40 Gly Leu Gln Tyr Phe Gly Thr Ala Thr Asp Asn Pro Glu Leu Thr Asp
 35 40 45

45 Ile Pro Tyr Val Thr Gln Leu Asn Asn Thr Ala Asp Phe Gly Gln Ile
 50 55 60

Thr Pro Gly Asn Ser Met Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly
 65 70 75 80

50 Thr Phe Thr Phe Thr Lys Gly Asp Val Ile Ala Asp Leu Ala Glu Gly
 85 90 95

55 Asn Gly Gln Tyr Leu Arg Cys His Thr Leu Val Trp Tyr Asn Gln Leu
 100 105 110

ES 2 712 402 T3

5 Pro Ser Trp Val Thr Ser Gly Thr Trp Thr Asn Ala Thr Leu Thr Ala
 115 120 125
 10 Ala Leu Lys Asn His Ile Thr Asn Val Val Ser His Tyr Lys Gly Lys
 130 135 140
 15 Cys Leu His Trp Asp Val Val Asn Glu Ala Leu Asn Asp Asp Gly Thr
 145 150 155 160
 20 Tyr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr Thr Thr Ile Gly Glu Ala Tyr Ile Pro
 165 170 175
 25 Ile Ala Phe Ala Ala Ala Ala Ala Ala Asp Pro Asp Ala Lys Leu Phe
 180 185 190
 30 Tyr Asn Asp Tyr Asn Leu Glu Tyr Gly Gly Ala Lys Ala Ala Ser Ala
 195 200 205
 35 Arg Ala Ile Val Gln Leu Val Lys Asn Ala Gly Ala Lys Ile Asp Gly
 210 215 220
 40 Val Gly Leu Gln Ala His Phe Ser Val Gly Thr Val Pro Ser Thr Ser
 225 230 235 240
 45 Ser Leu Val Ser Val Leu Gln Ser Phe Thr Ala Leu Gly Val Glu Val
 245 250 255
 50 Ala Tyr Thr Glu Ala Asp Val Arg Ile Leu Leu Pro Thr Thr Ala Thr
 260 265 270
 55 Thr Leu Ala Gln Gln Ser Ser Asp Phe Gln Ala Leu Val Gln Ser Cys
 275 280 285
 60 Val Gln Thr Thr Gly Cys Val Gly Phe Thr Ile Trp Asp Trp Thr Asp
 290 295 300
 65 Lys Tyr Ser Trp Val Pro Ser Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Ala Ala Leu
 305 310 315 320
 70 Pro Trp Asp Glu Asn Leu Val Lys Lys Pro Ala Tyr Asn Gly Leu Leu
 325 330 335

ES 2 712 402 T3

Ala Gly Met Gly Val Thr Val Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala
 340 345 350

5 Thr Ala Thr Gly Lys Thr Thr Thr Thr Thr Thr Gly Ala Thr Ser Thr
 355 360 365

10 Gly Thr Thr Ala Ala His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Leu Asn Trp Ser
 370 375 380

15 Gly Pro Thr Ala Cys Ala Thr Gly Tyr Thr Cys Thr Tyr Val Asn Asp
 385 390 395 400

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
 405

20

<210> 5
 <211> 45
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador PCR

30 <400> 5
 cgatgccata ctctggtctg gtacagtcag ctaccgaact ggggt 45

<210> 6
 35 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 40 <223> cebador PCR

<400> 6
 accccagttc ggtagctgac tgtaccagac cagagtatgg catcg 45

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de xilanasa, que comprende una sustitución al menos en una posición correspondiente a la posición 87 del polipéptido de la SEQ ID n°: 3, en la que la variante tiene actividad de xilanasa y tiene una tolerancia incrementada a los inhibidores de xilanasa en comparación con la xilanasa de la SEQ ID n°: 3; y en la que la variante tiene al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID n°: 3 y en la que la sustitución es H87Y.
- 10 2. Variante de xilanasa según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de xilanasa es un inhibidor proteico derivado del trigo u otros cereales.
- 15 3. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la variante tiene un aumento en la actividad relativa de xilanasa sobre la xilanasa de tipo salvaje de al menos un factor 7x, particularmente 8x, particularmente 8,5x más particularmente 9x, en presencia de inhibidores de xilanasa de trigo en cantidades que reducirán la actividad de xilanasa de tipo salvaje a menos del 10%.
- 20 4. Polinucleótido que codifica la variante de xilanasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 25 5. Construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
6. Vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
7. Célula hospedadora que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
8. Método para producir una variante de xilanasa, que comprende: cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 7 en condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y recuperar la variante.
9. Planta, parte de planta o célula vegetal transgénica que comprende el polinucleótido de la reivindicación 4.
10. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende las etapas de: (a) licuar material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa; (b) sacarificar el material licuado; y (c) fermentarlo con un organismo fermentador; en el que la variante de xilanasa de las reivindicaciones 1-3 está presente durante la etapa (a).
11. Proceso de producción de un producto de jarabe a partir de material que contiene almidón, que comprende la etapa de: (a) mezclar el material que contiene almidón seco con agua para formar una pulpa, (b) licuar el material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa ; (c) sacarificar el material licuado en presencia de una glucoamilasa, en el que la variante de xilanasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 está presente durante la etapa (a) y/o (b).
12. Proceso de la reivindicación 10 u 11, en el que el material que contiene almidón comprende trigo o cebada.
13. Proceso para producir un producto de fermentación, que comprende:
- (a) sacarificar un material celulósico o que contiene xilano con una composición enzimática en presencia del polipéptido que tiene actividad de xilanasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-3;
- (b) fermentar el material celulósico sacarificado o que contiene xilano con uno o más microorganismos de fermentación para producir el producto de fermentación; y
- (c) recuperar el producto de fermentación de la fermentación.
14. Proceso según las reivindicaciones 10 o 13, en el que el producto de fermentación es etanol.
15. Composición que comprende la variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
16. Composición según la reivindicación 15, que comprende además una alfa-amilasa y una proteasa y, opcionalmente, una glucoamilasa.
17. Proceso para degradar un material que contiene xilano, que comprende: tratar el material de xilano con una composición enzimática de la reivindicación 15.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que la composición comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una endoglucanasa, una celobiohidrolasa y una beta-glucosidasa.
19. Formulación de caldo de cultivo completo o composición de cultivo celular, que comprende la variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

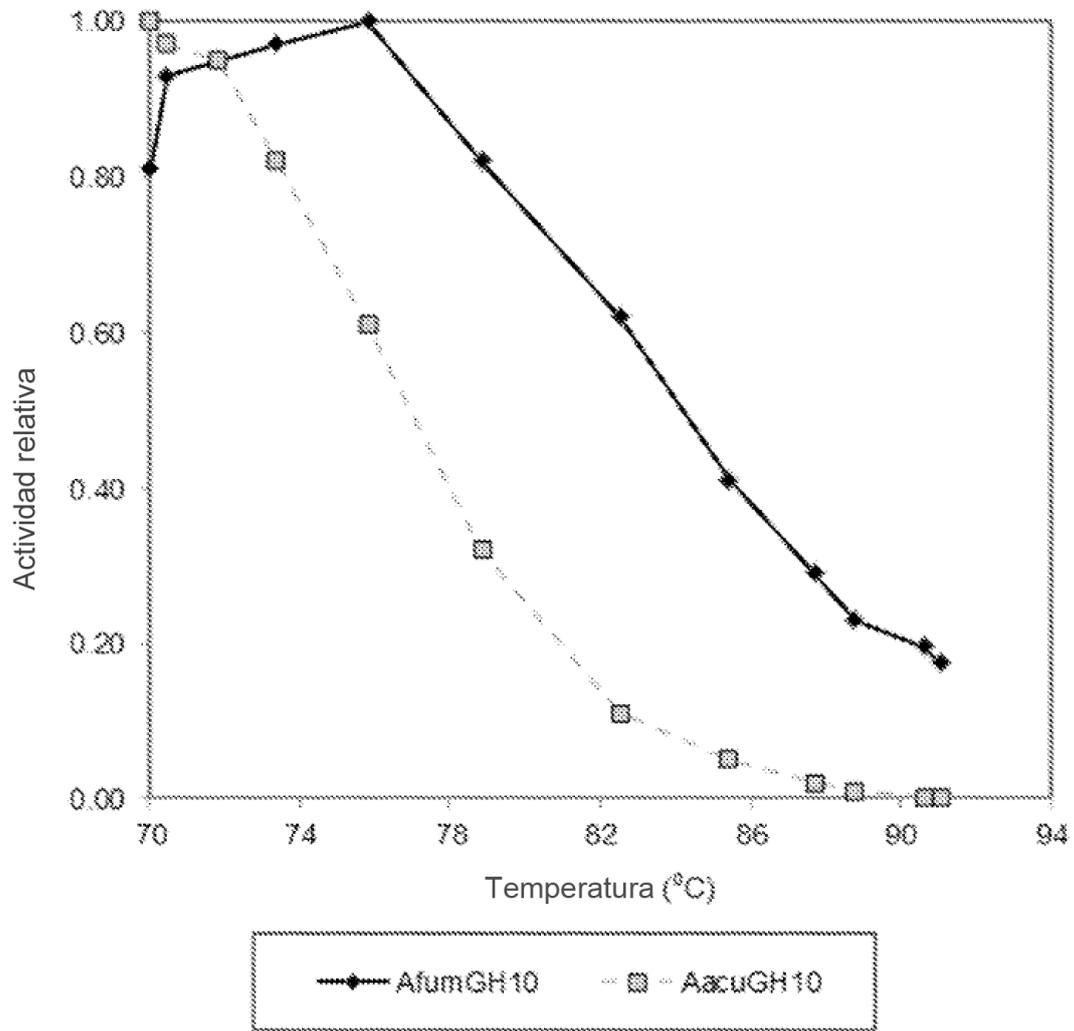


FIGURA 1

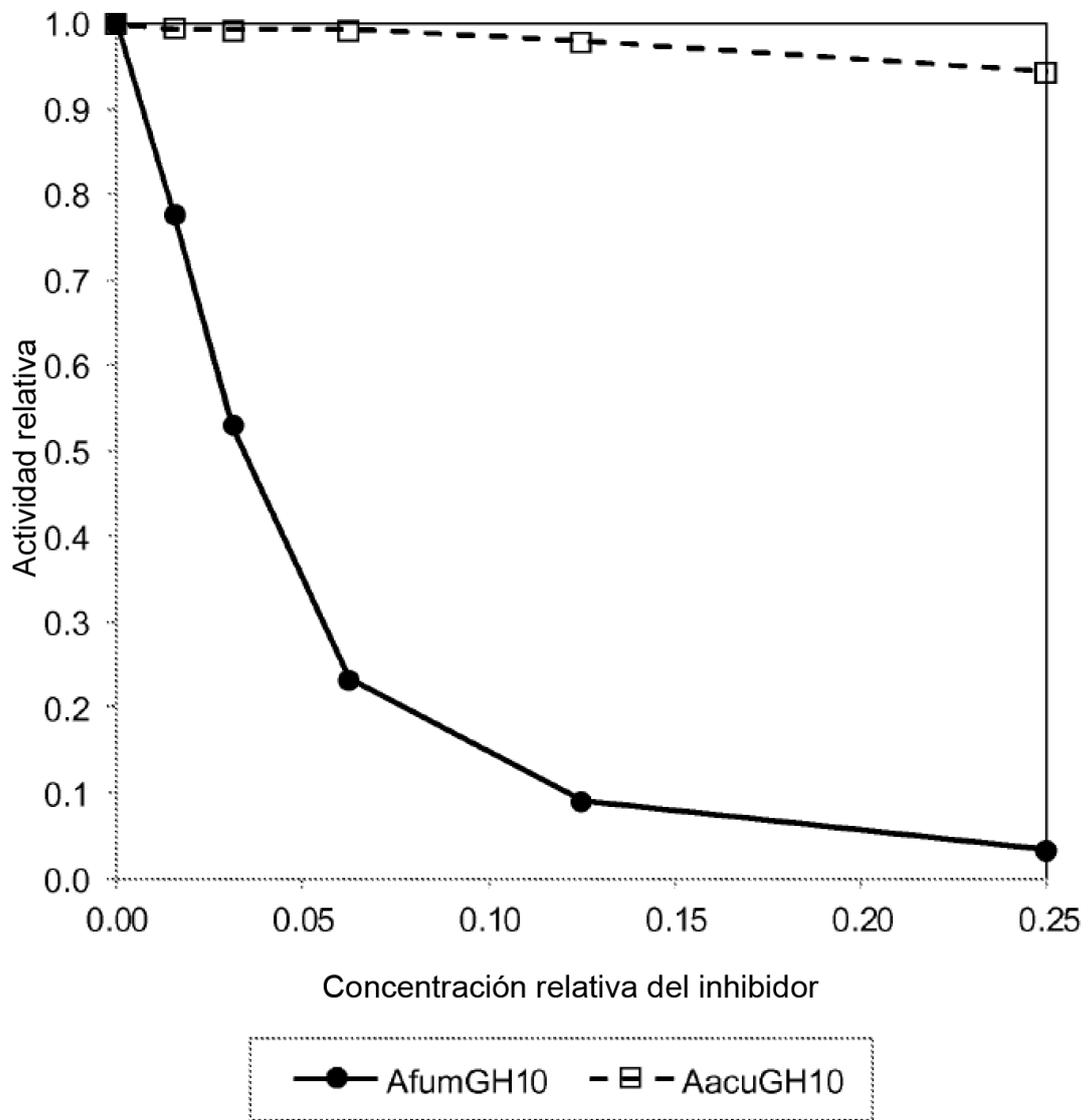


FIGURA 2

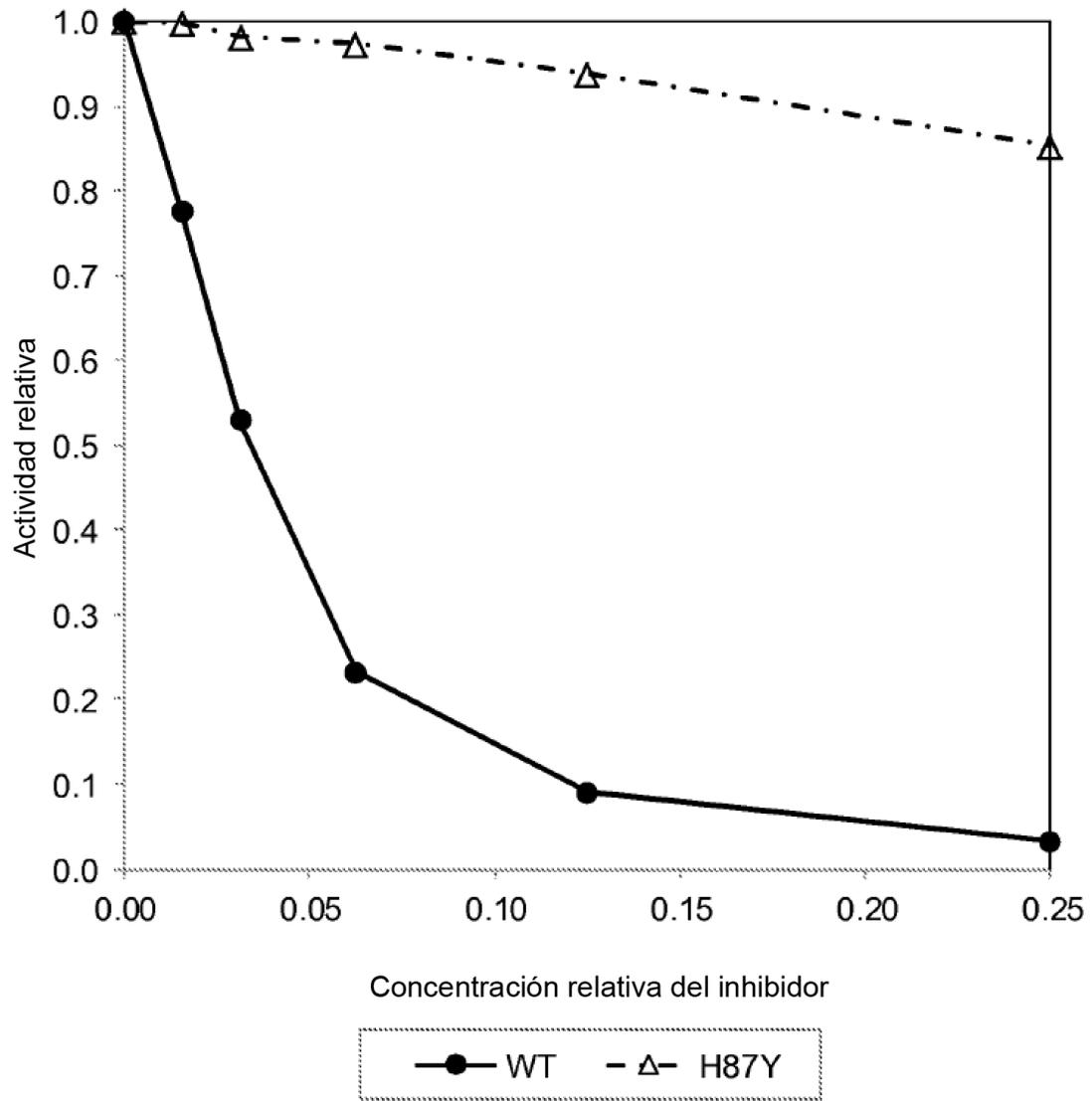


FIGURA 3

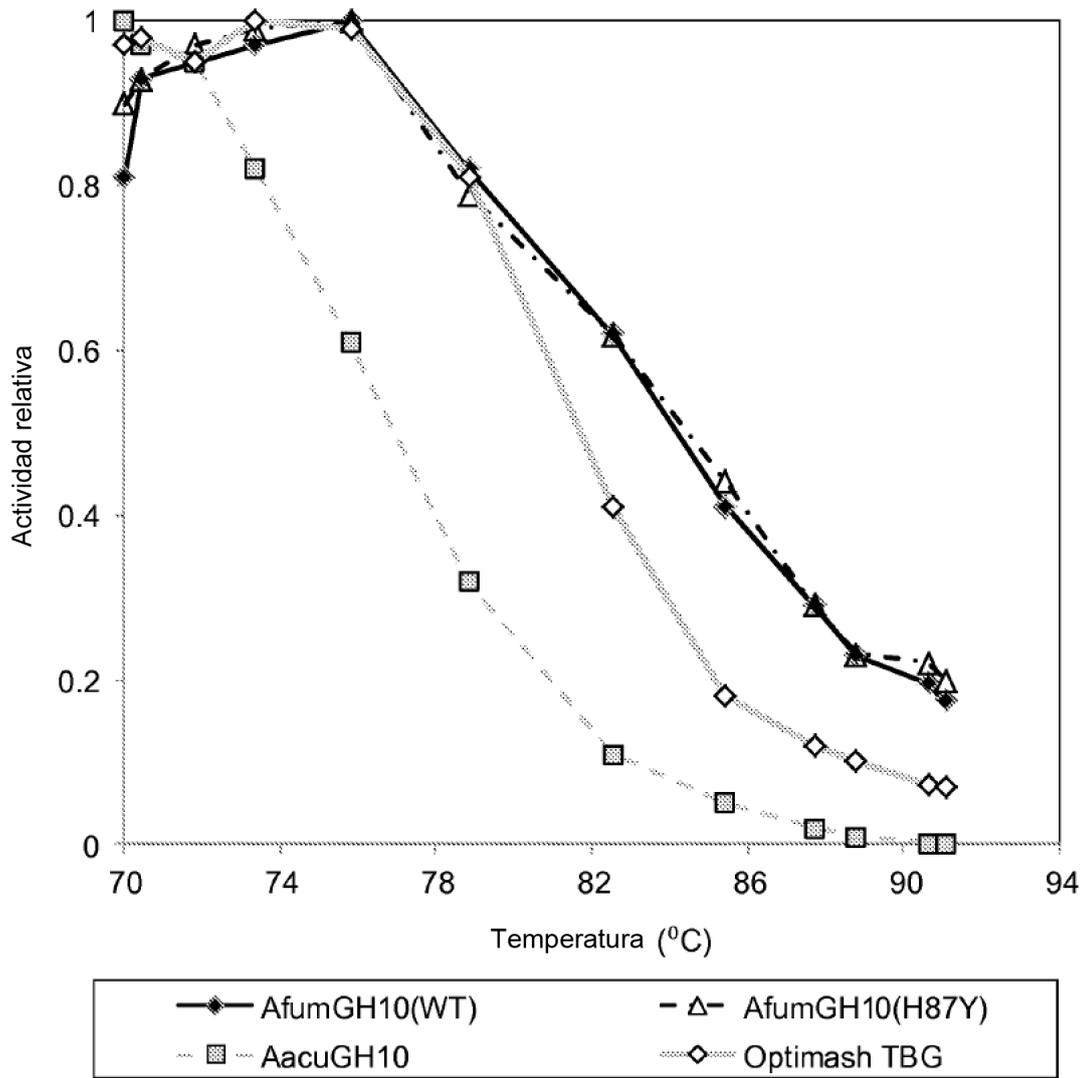


FIGURA 4