

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 145**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12P 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/EP2013/066255**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13744573 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2880157**

54 Título: **Xilanasas para solubilizar material que contiene arabinoxilano**

30 Prioridad:

03.08.2012 WO PCT/CN2012/079650
23.07.2013 CN 201310311358

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

04.12.2019

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

ARENT, SUSAN LUND;
LAURSEN, BRIAN SØGAARD;
KIARIE, ELIJAH GITUANJAH;
MILLÁN, LUIS FERNANDO ROMERO;
ZHANG, ZHENGHONG;
LAU, ROSALYN;
YU, ZHEYONG;
KOORY, FLOOR KLAASKE;
VAN TUIJL, JAN HENDRIK;
KOOPS, BART CHRISTIAAN;
PEDERSEN, MADS BRØGGER y
DALSGAARD, SØREN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 734 145 T3

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

DESCRIPCIÓN

Xilanasas para solubilizar material que contiene arabinoxilano

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de xilanasas que tienen propiedades inusuales en aplicaciones, que incluyen piensos, en la elaboración de cerveza o malteado, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilano como materiales a base de grano, p. ej., en la producción de biocombustible u otros productos de fermentación, que incluyen productos bioquímicos (p. ej., isopreno de origen biológico), y/o en la industria de separación de gluten-almidón de trigo y métodos que usan estas xilanasas, así como composiciones (como composiciones de aditivos alimentarios) que comprenden dichas xilanasas. La presente invención también se refiere a una nueva xilanasas con propiedades inusuales que la hacen útil en aplicaciones, que incluyen piensos, en la elaboración de cerveza o malteado, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilano como materiales a base de grano, p. ej. en la producción de biocombustible o productos bioquímicos (p. ej., isopreno de origen biológico) y/o en la industria de separación de gluten-almidón de trigo.

Antecedentes de la invención

15 Durante muchos años, las endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (referidas en esta memoria como xilanasas) se han usado para la modificación de carbohidratos complejos derivados del material de la pared celular vegetal. Es bien sabido en la técnica que la funcionalidad de diferentes xilanasas (derivadas de diferentes microorganismos o plantas) difiere enormemente. Xilanasas es el nombre que se da a una clase de enzimas que degradan el polisacárido lineal beta-1,4-xilano en xilooligosacáridos o xilosa, rompiendo así la hemicelulosa, uno de los componentes principales de las paredes celulares vegetales.

En base a la información estructural y genética, las xilanasas se han clasificado en diferentes familias de Glucósido Hidrolasas (GH) (Henrissat, (1991) Biochem. J. 280, 309-316).

25 Inicialmente todas las xilanasas conocidas y caracterizadas pertenecían a las familias GH10 o GH11. El trabajo adicional identificó después otros numerosos tipos de xilanasas pertenecientes a las familias GH5, GH7, GH8 y GH43 (Collins et al (2005) FEMS Microbiol. Rev., 29(1), 3-23).

Hasta ahora la familia GH11 difiere de todas las demás GH ya que es la única familia que consiste únicamente en xilanasas específicas para xilano. La estructura de las xilanasas GH11 se puede describir como una estructura de rodillo de gelatina β o una estructura plegada de sándwich de lámina β (Himmel et al 1997 Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65, 315-325). Las enzimas GH11 tienen un dominio catalítico de aproximadamente 20 kDa.

30 Las xilanasas GH10 tienen un dominio catalítico con pesos moleculares en el intervalo de 32-39 kDa. La estructura del dominio catalítico de las xilanasas GH10 consiste en un barril α/β de ocho veces (Harris et al 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

35 Las estructuras tridimensionales están disponibles para un gran número de enzimas de la familia GH10, la primera resuelta es la de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (Derewenda et al J. Biol. Chem. 1994 Ago. 19; 269(33) 20811-4), la endo-glucanasa Cex de *C. fimi* (White et al Biochemistry 1994 Oct 25; 33(42) 12546-52) y Xyn 10A de *Cellvibrio japonicus* (previamente xilanasas A de la subespecie *Pseudomonas fluorescens*) (Harris et al Structure 1994 Nov 15; 2(11) 1107-16). Como miembros del Clan GHA, tienen un plegamiento clásico de barril TIM (α/β)₈ con los dos ácidos glutámicos clave del sitio activo situados en los extremos C-terminales de las cadenas beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995 Jul 18; 92(15) 7090-4).

40 Se han realizado estudios exhaustivos que caracterizan la funcionalidad de las xilanasas sobre sustratos puros y bien caracterizados (Kormelink et al., 1992 Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes. Ph. D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Hollans (175 pp., resúmenes en Inglés y alemán)). Estos estudios muestran que diferentes xilanasas tienen diferentes requisitos específicos con respecto a la sustitución del esqueleto de xilosa del arabinoxilano (AX). Algunas xilanasas requieren tres residuos de xilosa no sustituidos para hidrolizar el esqueleto de xilosa; otras requieren solamente uno o dos. Las razones para estas diferencias en especificidad se cree que se deben a la estructura tridimensional dentro de los dominios catalíticos que a su vez depende de la estructura primaria de la xilanasas, es decir, la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, no se ha documentado hasta ahora la traducción de estas diferencias en las secuencias de aminoácidos en diferencias en la funcionalidad de las xilanasas cuando la xilanasas actúa en un entorno complejo, como un material vegetal, p. ej., en un pienso.

50 Los sustratos de xilanasas en material vegetal, p. ej., en trigo, se han dividido tradicionalmente en dos fracciones: El AX no extraíble con agua (WU-AX) y el AX extraíble con agua (WE-AX). Ha habido numerosas explicaciones de por qué hay dos fracciones diferentes de AX. La literatura más antigua (D'Appolonia and MacArthur – (1976, Cereal Chem. 53, 711-718) y Montgomery and Smith (1955, J. Am. Chem. Soc. 77, 3325-332) describen diferencias bastante grandes en el grado de sustitución entre WE-AX y WU-AX. El alto grado de sustitución se encontró en WE-AX. Esto se usó para explicar por qué algunos de los AX eran extraíbles. El alto grado de sustitución hizo que el polímero fuera soluble

en comparación con un menor grado de sustitución lo que causaría la unión por hidrógeno entre polímeros y, por consiguiente, la precipitación.

Se ha pensado que la diferencia entre la funcionalidad de las diferentes xilanasas se debe a diferencias en la especificidad de la xilanasas y, por lo tanto, su preferencia por los sustratos WU-AX o los WE-AX.

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

10 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N°. 1) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Esta es la pre-pro-proteína. La parte subrayada (en minúscula) de la secuencia refleja un péptido señal N terminal que se puede escindir antes de que la enzima madure. Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva también se pueden escindir por modificación post-traducciona antes de que la enzima esté completamente madura.

- 15 La Figura 2 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N°. 2) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Esta es la pre-pro-proteína. Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva también se pueden escindir mediante modificación post-traducciona antes de que la enzima esté completamente madura.

La Figura 3 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N°. 3) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Esta es la forma activa de la enzima. Esta se puede referir en esta memoria como la forma madura de la enzima.

- 20 La Figura 4 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 4) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Los nucleótidos en minúsculas que están en negrita muestran la secuencia del intrón. La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 5 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 5) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

- 25 La Figura 6 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 6) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4).

La Figura 7 muestra un esquema de un auto-analizador para la determinación de pentosano mediante un método de floroglucinol automatizado: (a) Ácido acético mezclado con HCl; (b) aire burbujeante; (c) floroglucinol en etanol; (d) muestra; (e) acelerador de muestra; (f) salida de la célula de flujo; (g) bomba peristáltica; (h) bobina de vidrio; (i) termostato (96°C); (j) espectrofotómetro de múltiple longitud de onda (410, 510, 550 y 620 nm); (k) residuos; (l) ordenador (Rouau & Surget, 1994 Carbohydrate Polymers 24, 123-32).

- 30 La Figura 8 muestra la liberación de pentosano (azúcar C-5) (solubilización de pentosanos) de salvado de trigo en función de la dosis de xilanasas. Las xilanasas usadas fueron la xilanasas de la presente invención (FveXyn4) en comparación con una xilanasas de referencia llamada Econase® XT.

- 35 La Figura 9 muestra la solubilización de pentosanos de cDDGS en función de la dosis de xilanasas. Las xilanasas usadas fueron la xilanasas de la presente invención (FveXyn4) en comparación con una xilanasas de referencia llamada Econase® XT.

La Figura 10 muestra un mapa plasmídico de pZZH254.

La Figura 11 muestra el perfil de actividad de pH de FveXyn4.

- 40 La Figura 12 muestra el perfil de temperatura de FveXyn4.

La Figura 13 muestra la reducción de la viscosidad en trigo de alta viscosidad por FveXyn4 en un modelo animal *in vitro* (donde el pH se mantuvo a 6,0).

La Figura 14 muestra los perfiles de viscosidad RVA en el trigo entero molido a partir de pH 5,2 para la xilanasas de acuerdo con la presente invención, concretamente FveXyn4, y las enzimas de referencia Xylathin™.

- 45 La Figura 15 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N°. 9) de una xilanasas descrita en esta memoria (FoxXyn2). Esta es la pre-pro-proteína. La parte subrayada (en minúscula) de la secuencia puede reflejar un péptido señal N terminal que se puede escindir antes de que la enzima madure. Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva también se pueden escindir mediante modificación post-traducciona antes de que la enzima esté completamente madura.

- 5 La Figura 16 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N°. 10) de una xilanasa descrita en esta memoria (FoxXyn2). Esta es la pro-proteína. Los aminoácidos que se muestran en negrita y en cursiva también se pueden escindir por modificación post-traducciona antes de que la enzima esté completamente madura. Esta secuencia puede ser una forma activa de la proteína y puede ser una forma activa de la proteína. Esta se puede denominar en esta memoria como la forma madura de la enzima.
- La Figura 17 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N°. 11) de una xilanasa descrita en esta memoria (FoxXyn2). Esta es otra forma activa de la enzima. En algunas realizaciones, esto se puede denominar en esta memoria como la forma madura de la enzima.
- 10 La Figura 18 muestra los perfiles de viscosidad RVA en el trigo entero molido a partir de pH 5,2 para la xilanasa de acuerdo con la presente invención, concretamente FoxXyn2, y las enzimas de referencia Xylathin™.
- La Figura 19 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 12) que codifica una xilanasa descrita en esta memoria (FoxXyn2). Los nucleótidos en minúscula que están en negrita muestran la secuencia del intrón. La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).
- 15 La Figura 20 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 13) que codifica una xilanasa descrita en esta memoria (FoxXyn2). La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).
- La Figura 21 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 14) que codifica una xilanasa descrita en esta memoria (FoxXyn2).
- La Figura 22 muestra un mapa plasmídico de pZZH135.
- La Figura 23 muestra el perfil de pH de FoxXyn2.
- 20 La Figura 24 muestra el perfil de temperatura de FoxXyn2.
- La Figura 25 muestra una secuencia polipeptídica (SEQ ID N°. 15) de una xilanasa descrita en esta memoria (de Fusarium) – Proyecto de Secuenciación Comparativa de Fusarium, Broad Institute of Harvard y MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). En algunas realizaciones, esta se puede denominar en esta memoria como la forma madura de la enzima.
- 25 La Figura 26 muestra un alineamiento de las proteínas maduras para FveXyn4 (SEQ ID N°. 3), FoxXyn2 (SEQ ID N°. 11) y la xilanasa mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 15.
- La Figura 27 muestra el efecto de los tratamientos con xilanasa y proteasa solos y en combinación sobre la solubilización de pentosano y proteína a partir de DDGS de maíz insoluble. Las letras a-d son significativamente diferentes de acuerdo con las comparaciones de ANOVA de una vía y Holm-Sidak con nivel de significancia general en P=0,05. Las barras de error indican S.D.
- 30 La Figura 28 muestra el efecto de los tratamientos con xilanasa y proteasa solos y en combinación sobre la solubilización de pentosano y proteína a partir de DDGS de trigo insoluble. Las letras a-d son significativamente diferentes de acuerdo con las comparaciones de ANOVA de una vía y Holm-Sidak con nivel de significancia general en P=0,05. Las barras de error indican S.D.
- 35 La Figura 29 muestra la solubilización de pentosanos a partir de cDDGS en función de la dosis de xilanasa. Las xilanasas usadas fueron las xilanasas de la presente invención (FveXyn4 y FoxXyn2).
- La Figura 30 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 16) que codifica una xilanasa descrita en esta memoria de Fusarium – obtenida del Proyecto de Secuenciación Comparativa de Fusarium, Broad Institute of Harvard y MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). Los nucleótidos en minúscula que están en negrita muestran la secuencia del intrón. La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas). Los cambios en comparación con la SEQ ID N°. 4 están subrayados.
- 40 La Figura 31 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 17) que codifica una xilanasa descrita en esta memoria de Fusarium – obtenida del Proyecto de Secuenciación Comparativa de Fusarium, Broad Institute of Harvard y MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas). Los cambios en comparación con la SEQ ID N°. 5 están subrayados.
- 45 La Figura 32 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID N°. 18) que codifica una xilanasa descrita en esta memoria de Fusarium – obtenida del Proyecto de Secuenciación Comparativa de Fusarium, Broad Institute of Harvard y MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). Los cambios en comparación con la SEQ ID N°. 6 están subrayados.

Resumen de la invención

- 50 Un hallazgo fundamental de la presente invención es una nueva xilanasa aislada de *Fusarium verticilloides*, cuya enzima tiene propiedades sorprendentes e inesperadas. En particular, es inesperadamente buena para romper

- (solubilizar) los arabinoxilanos insolubles (AXinsol). Sorprendentemente, se ha descubierto que la enzima rompe (solubiliza) eficazmente AXinsol de una amplia gama de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular maíz y sustratos a base de maíz, en particular tanto de trigo (que incluyen productos a base de trigo) como de maíz (que incluyen productos a base de maíz). Esto contrasta con las anteriores enzimas conocidas, que frecuentemente son inferiores en la solubilización de AXinsol en sustratos de maíz o a base de maíz o que no son eficaces en sustratos tanto de trigo como de maíz.
- Además, la enzima de la presente invención es particularmente buena no solo para romper (solubilizar) AXinsol, sino también para romper (o degradar) los polímeros solubilizados eficazmente. Al ser capaces de degradar eficazmente (de forma rápida) los polímeros solubilizados (obtenidos al disolver AXinsol), se obtiene una reducción (rápida) de la viscosidad o los polímeros solubilizados (obtenidos de la disolución de AXinsol) no pueden contribuir a aumentar la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.
- Sin desear estar limitados por la teoría, la enzima de la presente invención libera principalmente polímeros que no contribuyen a la viscosidad porque los polímeros liberados son cortos.
- Por primera vez, los presentes inventores han aislado y secuenciado esta nueva xilanasas.
- Típicamente, las xilanasas convencionales pueden romper el AXinsol, pero a menudo dan lugar a un aumento en la viscosidad de la mezcla. Este aumento de la viscosidad es desfavorable en muchas aplicaciones.
- Sin desear estar limitados por la teoría, aunque algunas xilanasas convencionales rompen el AXinsol, dan lugar a un aumento de los productos solubles de degradación de alto peso molecular, lo que da lugar a un aumento en la viscosidad en la mezcla.
- Además o alternativamente y de nuevo sin desear estar limitados por la teoría, las enzimas de xilanasas convencionales pueden romper el AXinsol, pero debido a que no degradan los productos solubilizados de alto peso molecular lo suficientemente rápido, la viscosidad de la mezcla no es ideal. En contraste, con los métodos y usos de la presente invención, las xilanasas rompen el AXinsol sin aumentar la viscosidad y/o mientras reducen la viscosidad rápidamente en comparación con las enzimas convencionales. Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que los productos de alto peso molecular no se forman por las enzimas de la presente invención.
- Se ha encontrado que las enzimas de la presente invención, y como se describe en esta memoria, no solo rompen (solubilizan) arabinoxilanos solubles (AXinsol) de una amplia gama de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular sustratos de maíz y a base de maíz, en particular tanto productos de trigo (que incluyen los de a base de trigo) como maíz (que incluyen productos a base de maíz), sino que también aseguran de manera eficaz que no se aumenta y/o se reduce la viscosidad. Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que los productos de alto peso molecular no se forman por las enzimas de la presente invención.
- Por lo tanto, la presente invención se refiere a enzimas capaces de solubilizar pentosanos, en particular materiales que contienen xilano, como arabinoxilanos, en particular arabinoxilanos insolubles. En particular la enzima es particularmente buena para solubilizar pentosanos en particular materiales que contienen xilano, como arabinoxilanos, en particular arabinoxilanos insolubles, en una amplia gama de sustratos, que incluyen sustratos a base de maíz.
- La presente invención se refiere además a enzimas capaces de degradar AXsol o los productos de ruptura de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o se reduzca en la mezcla de reacción.
- Muchas de las xilanasas comercializadas para usar en piensos para solubilizar pentosanos son enzimas GH11. Los expertos en la técnica habían considerado que las xilanasas GH10 no eran tan potentes en la solubilización de pentosanos, particularmente AXinsol, en comparación con las xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha encontrado que la nueva xilanasas descrita en esta memoria que es una xilanasas GH10, es particularmente buena para degradar el AXinsol en un amplio espectro de sustratos, que incluyen sustratos a base de maíz. Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que las xilanasas GH10 de la presente invención superan a las xilanasas GH11 en su capacidad para solubilizar pentosanos.
- Es significativamente ventajoso el hecho de que las enzimas presentes degraden eficazmente el AXinsol del maíz y sustratos a base de maíz, ya que el maíz tiene mucho más AX en la forma insoluble en comparación con otros cereales, como el trigo y el centeno, por ejemplo. Por lo tanto, solo las xilanasas que pueden romper AXinsol pueden mostrar un beneficio significativo para los animales alimentados con dieta a base de maíz, como la dieta de maíz-soja, por ejemplo.
- Era completamente inesperado que una xilanasas GH10 fuera tan buena para degradar el AXinsol, particularmente en sustratos de maíz o a base de maíz.
- Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar eficazmente (y rápidamente) los polímeros y oligómeros que se producen de la degradación del AXinsol o que están presentes en material a base de grano. Esto da lugar a una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 mostradas en esta memoria en que son particularmente buenas en varias aplicaciones para mantener baja la viscosidad o para reducir la viscosidad, p. ej., en piensos; en

elaboración de la cerveza y/o malteado; en la producción de glucosa a base de grano, p. ej., para el posterior procesamiento de biocombustibles y/o productos bioquímicos (p. ej., isopreno de origen biológico); o en la industria de la separación de gluten-almidón del trigo para la producción de almidón, por ejemplo.

5 Especialmente se ha encontrado que el producto de degradación en promedio es más corto para las enzimas GH10 analizadas en esta memoria en comparación con las enzimas GH11. Esto significa que los productos de degradación no contribuyen o causan un aumento de la viscosidad.

10 En base a estos hallazgos, las xilanasas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para degradar un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente AXinsol. Además o alternativamente, las xilanasas de acuerdo con la presente invención se pueden usar para degradar polímeros solubles (p. ej. oligómeros) que se producen de la degradación de AXinsol o que están presentes (de manera natural) en materiales a base de grano. Sorprendentemente, se ha encontrado que las xilanasas de acuerdo con la presente invención se pueden usar tanto para degradar un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, en particular AXinsol, como para degradar polímeros solubles (p. ej., oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol.

15 Tales enzimas encuentran una aplicación útil en muchas industrias, que incluyen piensos, malteado y elaboración de cerveza, en el tratamiento de arabinoxilano que contiene materias primas como materiales a base de grano, en la industria de separación de gluten-almidón del trigo, en la producción de jarabes derivados de almidón, en la producción de biocombustible y similares.

20 Solo se encontraron estos efectos técnicos sorprendentes e inesperados a través del aislamiento y la prueba de FveXyn 4 (SEQ ID N°. 3). Posteriormente fue posible identificar otras enzimas de acción similar (p. ej., SEQ ID N°. 11 y/o SEQ ID N°. 15).

Declaraciones de la invención

25 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para degradar material que contiene arabinoxilano insoluble en un material que contiene xilano, que comprende mezclar dicho material que contiene xilano con una xilanasas que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 3, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1; o una variante u homólogo de estas que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N°. 3 o la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N°. 3, la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1 con una sustitución conservativa de al menos uno y de menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasas que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 6, SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N°. 6, SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N°. 6, SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N°. 6, la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4 debido a la degeneración del código genético.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una xilanasas que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 3, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1; o una variante u homólogo de esta que tenga al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N°. 3 o la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1; o una secuencia polipeptídica que comprende SEQ ID N°. 3, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1 con una sustitución conservativa de al menos uno o menos de 15 aminoácidos; o una xilanasas que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 6, SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N°. 6, la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N°. 6, la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N°. 6, o la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4 debido a la degeneración del código genético para solubilizar arabinoxilano en un material que contiene xilano.

45 En un aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido que tiene actividad xilanasas que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1, o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 99% de identidad con la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1; o un polipéptido que está codificado por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% de identidad con la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia de polinucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

50 a) una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1, o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 99% de identidad con la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1; o

55 b) una secuencia de polinucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4; o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% de identidad (preferiblemente un 98% de identidad) con la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4.

La presente invención se refiere además a una composición de aditivo alimentario o una premezcla que comprende (o consiste esencialmente en o que consiste en) una xilanasas que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 1; o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 3 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1; o una secuencia polipeptídica que comprende SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 1 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasas que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 4, o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4 debido a la degeneración del código genético, o un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 y opcionalmente al menos un mineral y/o al menos una vitamina.

La presente invención se refiere además a un método para preparar un pienso que comprende mezclar un componente alimentario con una xilanasas que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 1; o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 3 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N° 3, la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasas que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 4, o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos con al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4 debido a la degeneración del código genético; un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, o una composición de aditivo alimentario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.

La presente invención se refiere además a un pienso que comprende una composición de aditivo alimentario o premezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 u obtenido por el método de la reivindicación 12.

La presente invención se refiere además al uso de una composición de aditivo alimentario o premezcla de acuerdo con la reivindicación 10 en un alimento o un pienso de acuerdo con la reivindicación 13 para mejorar el rendimiento del animal, que incluye aumentar de la eficacia de alimentación y/o aumentar de peso y/o reducir la relación de conversión de la alimentación y/o mejorar la digestibilidad de los nutrientes o energía en un alimento y/o mejorar la retención de nitrógeno y/o mejorar la respuesta inmune en el sujeto que se da como resultado del uso de la composición de aditivo alimentario de la presente invención en la alimentación en comparación con la alimentación que no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

Para evitar dudas, la SEQ ID N° 3 es la forma madura de la SEQ ID N° 1 o de la SEQ ID N° 2.

Así mismo, la SEQ ID N° 11 es la forma madura de la SEQ ID N° 9 o de la SEQ ID N° 10.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en esta memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta descripción. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, New York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan un recurso con un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

Esta descripción no está limitada por los métodos y materiales ejemplares descritos en esta memoria y cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria se pueden usar en la práctica o en el ensayo de realizaciones de esta descripción. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo.

A menos que se indique lo contrario, cualquier secuencia de ácido nucleico se escribe de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación amino a carboxi, respectivamente.

Los encabezados proporcionados en esta memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta descripción que se pueden tener por referencia a la especificación en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente por referencia a la especificación en su conjunto.

En esta memoria se refieren los aminoácidos usando el nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una sola letra.

El término "proteína", como se usa en esta memoria, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

Como se usa en esta memoria, el término “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “polipéptido” y/o el término “proteína”. En algunos casos, el término “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “péptido”. En algunos casos, el término “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “enzima”.

5 Los términos “proteína” y “polipéptido” se usan de manera intercambiable en esta memoria. En la presente descripción y reivindicaciones, se pueden usar los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los residuos de aminoácidos. El código de tres letras para los aminoácidos según se define en conformidad con la Comisión Conjunta de la IUPACIUB en la Nomenclatura Bioquímica (JCBN). También se entiende que un polipéptido puede estar codificado por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

10 Pueden aparecer otras definiciones de términos a lo largo de la especificación. Antes de que se describan con más detalle las realizaciones ejemplares, es de entender que esta descripción no se limita a las realizaciones particulares descritas, como tal, por supuesto, puede variar. También se debe entender que la terminología usada en esta memoria tiene el propósito de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente descripción estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

15 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que también se describe específicamente cada valor intermedio hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Se incluye dentro de esta descripción cada intervalo menor entre cualquier valor declarado o valor intermedio de un intervalo establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse o excluirse de forma independiente en el intervalo, y también se incluyen dentro de esta descripción cada intervalo en el que se incluye uno o ambos límites en los intervalos más pequeños, sujeto a cualquier límite específicamente
20 excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, también se incluyen en esta descripción los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de los límites incluidos.

25 Debe observarse que, tal como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la/lo” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a “una enzima” incluye una pluralidad de tales agentes candidatos y la referencia a “el alimento” incluye una referencia a uno o más alimentos y equivalentes de estos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

30 Las publicaciones discutidas en esta memoria se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en esta memoria se debe interpretar como una admisión de que dichas publicaciones constituyen un estado de la técnica anterior a las reivindicaciones adjuntas aquí.

35 El aumento de los precios de la materia prima usada tradicionalmente como fuente de energía en la alimentación animal, como materia prima en la producción de biocombustibles, como ingrediente en la elaboración de la cerveza y el malteado, o como una materia prima en procesos de separación de gluten-almidón del trigo, por ejemplo, han dado como resultado la inclusión de materiales fibrosos de bajo costo en los sustratos de partida para estas industrias, particularmente el uso de subproductos fibrosos de bajo coste en la alimentación animal.

40 La adición de fibra puede causar varios efectos desfavorables. Por ejemplo, en alimentación animal la adición de fibra puede causar efectos anti-nutricionales. La presencia de polímeros sin degradar presentes en el intestino del animal produce un contenido altamente viscoso y, como resultado, impide la difusión con una absorción reducida de nutrientes. Además, los polímeros poseen una alta capacidad de retención de agua que dificulta una reabsorción eficaz del agua, y la retención de agua aumenta el volumen del contenido intestinal lo que da lugar a una disminución del tiempo de tránsito intestinal (Englyst & Kingman (1993) en Human Nutrition and Dietetics, 9ª edición (Garrow J. S., James W. P. T., eds.) p. 53).

45 En los piensos, la hemicelulosa y la celulosa (que incluyen arabinosilano insoluble) también forman barreras físicas encapsulando (o atrapando) nutrientes como almidón y proteína y, por lo tanto, reteniendo el acceso a estos nutrientes para el animal.

50 La hemicelulosa y la celulosa (que incluye arabinosilanos insolubles (AXinsol)) por sí mismos también son fuentes potenciales de energía ya que consisten en sacáridos C5 y C6. Los monosacáridos C6 se pueden usar como fuente de energía por el animal, mientras los oligosacáridos C5 se pueden transformar en ácidos grasos de cadena corta por la microflora presente en el intestino del animal (van den Broek et al., 2008 Molecular Nutrition & Food Research, 52, 146-63), cuyos ácidos grasos de cadena corta pueden ser absorbidos y digeridos por el intestino del animal.

La liberación de nutrientes y agua de los piensos como una consecuencia de la degradación de la barrera física es dependiente de la capacidad de la xilanasa de degradar componentes de fibra insoluble (p. ej., arabinosilanos insolubles (AXinsol)).

En un aspecto, la presente invención se refiere a una nueva xilanasa.

55 En una realización, la presente invención proporciona una enzima xilanasa que comprende (o consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 1 o SEQ ID N°. 2 o una variante u homólogo de

esta que tiene al menos un 99% (p. ej., al menos un 99,1 o 99,5%) de identidad con la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2.

5 La presente invención también se refiere a una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% (p. ej., al menos un 98%, 98,5% o 99%) de identidad con la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5.

En un aspecto, la enzima xilanasa de la presente invención puede obtenerse de (u obtenerse a partir de) un hongo, llamado *Fusarium verticilloides*.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una xilanasa que se puede obtener de (u obtener a partir de) *Fusarium verticilloides* para usar en alimentos o en una composición de aditivo alimentario.

10 En una realización, la enzima xilanasa de la presente invención se puede denominar en esta memoria como FveXyn4 o Hifi168.

La presente invención también proporciona además un ácido nucleico que comprende (o consiste en) una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 4 o SEQ ID N° 5; o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% (p. ej., al menos un 98%, 98,5% o 99%) de identidad con la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5.

15 Tanto las secuencias polipeptídicas como las secuencias de ácido nucleico enseñadas en esta memoria están preferiblemente aisladas.

La xilanasa de la presente invención es preferiblemente una xilanasa GH10. En otras palabras, la xilanasa puede tener un peso molecular en el intervalo de 32-39 kDa y/o el dominio catalítico de la xilanasa consiste en una estructura de barril β/α de ocho veces (como se indica en Harris et al., 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

20 Se describe en esta memoria una composición que comprende una enzima xilanasa que comprende (o consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3 o una variante, homólogo, fragmento o derivado de esta que tiene al menos un 98,5% (p. ej., al menos un 98,8 o 99 o 99,1 o 99,5) de identidad con la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 3 o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 6, o una
25 secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% (p. ej., al menos un 98%, 98,5% o 99%) de identidad con la SEQ ID N° 4, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6.

En un aspecto, la enzima xilanasa para usar en los métodos y usos de la presente invención comprende (o consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3 o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 75% (adecuadamente al menos un 85% o al menos un 90% o al
30 menos un 99%) de identidad con la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 3, o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N° 1, la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 3 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 6, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% (adecuadamente al menos un 85% o al menos un 90% o al menos un 98%) de identidad con la SEQ ID N° 4
35 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6 o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6 debido a la degeneración del código genético.

En un aspecto, la enzima xilanasa para usar en los métodos y usos de la presente invención comprende (o consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3 o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ
40 ID N° 3; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N° 1, la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 3 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 6, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 85% de identidad con la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6 o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6 debido a la
45 degeneración del código genético.

En un aspecto, la enzima xilanasa para usar en los métodos y usos de la presente invención comprende (o consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3 o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ
50 ID N° 3; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N° 1, la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 3 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 6, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de identidad con la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6 o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6 debido a la
degeneración del código genético.

55 En un aspecto, la enzima xilanasa para usar en los métodos y usos de la presente invención comprende (o consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3 o una

- variante u homólogo de esta que tiene al menos un 99% de identidad con la SEQ ID N°. 1 o la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 3 o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N°. 1, la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 3 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 4, SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 6, o una
- 5 secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 98% de identidad con la SEQ ID N°. 4 o la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 6 o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N°. 4 o la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 6 debido a la degeneración del código genético.
- En una realización, la enzima xilanasa de la presente invención se puede denominar en esta memoria como FveXyn4 (este término se refiere a la proteína activa, p. ej., la proteína madura).
- 10 Descrito en esta memoria, la enzima xilanasa de la presente descripción se puede denominar en esta memoria como FoxXyn2 (este término se refiere a la proteína activa, p. ej., la proteína madura).
- En una realización, la xilanasa preferiblemente es una xilanasa fúngica.
- En una realización, la xilanasa preferiblemente es una xilanasa GH10.
- En una realización, la xilanasa preferiblemente es una xilanasa fúngica GH10.
- 15 En una realización, la xilanasa preferiblemente es una endoxilanasa, p. ej., una endo-1,4-β-xilanasa. La clasificación para una endo-1,4-β-xilanasa es E.C. 3.2.1.8.
- Preferiblemente la xilanasa de la presente invención tiene un pH óptimo de aproximadamente 6.
- Preferiblemente la xilanasa de la presente invención retiene más del 70% de la actividad máxima entre pH 4,6 y 7, preferiblemente entre pH 5,1 y 7.
- 20 Sin querer limitarse a la teoría, el pH también puede tener un efecto importante sobre la eficacia y eficiencia de la enzima. Para aplicaciones alimentarias en particular, el perfil de pH de las xilanasas de la presente invención favorece la actividad en el intestino delgado, en condiciones neutras.
- Preferiblemente la xilanasa de la presente invención tiene una temperatura óptima de aproximadamente 60°C.
- Preferiblemente la xilanasa de la presente invención retiene más del 70% de la actividad máxima entre 45°C y 64°C.
- 25 Las xilanasas de acuerdo con la presente invención son capaces de degradar (o degradan) un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente arabinoxilanos insolubles (AXinsol)).
- Descrito en esta memoria, las xilanasas de acuerdo con la presente descripción son capaces de degradar (o degradan) polímeros solubles (p. ej., oligómeros) que se producen de la degradación de AXinsol o que están presentes (de manera natural) en material a base de grano.
- 30 Descrito en esta memoria, las xilanasas de acuerdo con la presente descripción son capaces de degradar (o degradan) tanto un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente AXinsol, como polímeros solubles (p. ej., oligómeros) que se producen de la degradación de AXinsol.
- En una realización, las xilanasas de la presente invención no se ven afectadas por los inhibidores de las xilanasas de trigo, p. ej., inhibidores proteicos, p. ej., inhibidores proteicos del tipo TAXI en el trigo. Las xilanasas fúngicas de la
- 35 técnica anterior se pueden inhibir hasta en un 70-95% por los inhibidores proteicos del trigo. Preferiblemente las xilanasas de la presente invención solo se inhiben en un 20-30% como máximo en las aplicaciones del trigo.
- Los TAXI son inhibidores de xilanasas de *Triticum aestivum*, presentes en cereales.
- El término “que consisten esencialmente en” como se usa en esta memoria significa que pueden estar presentes componentes no especificados si las características de la composición reivindicada no se ven afectadas de forma
- 40 material.
- El término “que consiste en” significa que las proporciones de los ingredientes específicos deben sumar el 100%.
- El término “que comprende” usado en esta memoria se puede modificar en algunas realizaciones para referirse a que consiste esencialmente en o que consiste en (ambos tienen un significado más limitado que “que comprende”).
- En una realización, el material que contiene arabinoxilano insoluble no es paja de trigo.
- 45 Usos
- La xilanasa de la presente invención se puede usar adecuadamente en cualquiera de las siguientes aplicaciones:
- a) Un aditivo en piensos animales; y/o

b) Un suplemento alimentario para un animal; y/o

5 c) Ruptura de material a base de grano (p. ej., este puede ser de grano entero o parte del grano). Los productos de la ruptura (p. ej., glucosa) se pueden usar como una materia prima para cualquier proceso de fermentación, como en la producción de biocombustibles (p. ej., bioetanol) o en la producción de otros productos como productos bioquímicos (p. ej., isopreno de origen biológico). Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a la producción de biocombustible (p. ej., bioetanol) y a la utilización mejorada de material a base de grano en la industria de los biocombustibles; y/o

10 d) Industria de separación de gluten-almidón del cereal (p. ej., trigo). El (los) producto(s) resultante(s) pueden ser almidón (p. ej., almidón purificado) y/o gluten y/o fibras y/o solubles en agua (como pentosanos solubles). En una realización, la presente invención se refiere a la producción de almidón y/o gluten; y/o

e) Mejorar el malteado y la elaboración de cerveza, p. ej., rompiendo el material a base de grano (p. ej., cebada malteada).

En una realización, la xilanasas de la presente invención se usa en un pienso. Preferiblemente, un pienso que comprende maíz o es un pienso a base de maíz.

15 En una realización, la xilanasas de la presente invención se usa en el malteado o en la elaboración de la cerveza.

En una realización adicional, la xilanasas de la presente invención se usa en la separación de gluten-almidón del trigo.

En otra realización adicional, la xilanasas de la presente invención se usa en la ruptura de material a base de grano y puede ser parte del proceso de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol).

Para evitar dudas, la SEQ ID N°. 3 es la forma madura de la SEQ ID N°. 1 o la SEQ ID N°. 2.

20 De manera similar, la SEQ ID N°. 11 es la forma madura de la SEQ ID N°. 9 o la SEQ ID N°. 10.

Ventajas

La nueva xilanasas indicada en esta memoria tiene muchas ventajas en comparación con las xilanasas conocidas.

Las xilanasas como se indican en esta memoria y de la presente invención son inesperadamente buenas para solubilizar pentosanos.

25 Las xilanasas como se indican en esta memoria y de la presente invención son inesperadamente buenas para solubilizar AXinsol.

30 Sorprendentemente se ha encontrado que la xilanasas de la presente invención es particularmente buena en la degradación de materiales que contienen xilano, como arabinoxilanos, p. ej., AXinsol, en un amplio espectro de sustratos, maíz, trigo, DDGS, etc., en particular maíz y sustratos a base de maíz, en particular, tanto productos de trigo (incluyendo a base de trigo) como maíz (incluyendo productos a base de maíz). En comparación con las xilanasas de referencia que son todas xilanasas producidas y comercializadas todas de manera comercial, la nueva xilanasas descrita en esta memoria era capaz de una degradación y la liberación de pentosano a partir de materiales a base de plantas (en particular sustratos a base de maíz) mucho más eficaz en comparación con las xilanasas comercializadas. Esto fue completamente inesperado. Esto contrasta con las enzimas anteriormente conocidas, que a menudo son inferiores en la solubilización de AXinsol en maíz y sustratos a base de maíz o que no son tan eficaces en sustratos tanto de trigo como de maíz.

35 Además, la enzima de la presente invención es particularmente buena no solo para romper (solubilizar) AXinsol, sino también para romper (o degradar) los polímeros solubilizados de manera eficaz. Al ser capaz de romper (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos de disolver AXinsol), se obtiene una reducción de la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

40 Típicamente, las xilanasas convencionales pueden romper el AXinsol, pero darán lugar a un aumento en la producción de polímeros, productos que darán lugar a un aumento de viscosidad de la mezcla. Este aumento de la viscosidad es desfavorable en muchas aplicaciones.

45 Se ha encontrado que las enzimas de la presente invención y como se describe en esta memoria, no solo rompen (solubilizan) los arabinoxilanos insolubles (AXinsol) de una amplia gama de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular maíz y sustratos a base de maíz, en particular tanto los productos de trigo (incluidos los a base de trigo) como maíz (incluyendo productos a base de maíz), sino que también rompen eficazmente los polímeros así solubilizados para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o para reducir la viscosidad.

50 Las xilanasas de la presente invención y como se describe en esta memoria son capaces de degradar AXsol o los productos de ruptura de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o la viscosidad se reduzca en la mezcla de reacción.

- 5 Muchas de las xilanasas comercializadas para usar en piensos para solubilizar pentosanos son enzimas GH11. Los expertos en la materia habían considerado que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes en la solubilización de pentosanos, particularmente AXinsol, en comparación con las xilanasas GH11. De manera sorprendente, se ha encontrado que la nueva xilanasas descrita en esta memoria que es una xilanasas GH10 es particularmente buena para solubilizar AXinsol en un amplio espectro de sustratos, que incluyen sustratos a base de maíz. De manera sorprendente, los presentes inventores han encontrado que las xilanasas GH10 de la presente invención (y mostrado en esta memoria) superan a las xilanasas GH11 comerciales en su capacidad para solubilizar pentosanos.
- 10 El hecho de que las presentes enzimas solubilizan de manera eficaz AXinsol de maíz y sustratos a base de maíz, es significativamente ventajoso, ya que el maíz tiene mucho más AX en forma insoluble en comparación con otros cereales, como el trigo y el centeno, por ejemplo. Por lo tanto, solo las xilanasas que pueden romper el AXinsol pueden mostrar un beneficio significativo para los animales alimentados con dieta de maíz-soja, por ejemplo.
- Fue completamente inesperado que una xilanasas GH10 fuera tan buena en solubilizar AXinsol en cereales, particularmente en maíz o sustratos a base de maíz.
- 15 Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar de manera eficaz (y rápida) los polímeros y/u oligómeros que se producen a partir de la solubilización de AXinsol o que están presentes en materiales a base de grano. Esto da lugar a una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 indicadas en esta memoria en que son particularmente buenas en un número de aplicaciones para mantener la viscosidad baja o para reducir la viscosidad, p. ej., en piensos; en la elaboración de la cerveza y/o malteado; en la producción de glucosa a base de grano, p. ej., para procesamiento adicional a biocombustibles y/o productos bioquímicos (p. ej., isopreno de origen biológico); en la industria de separación de gluten-almidón del trigo para la producción de almidón, por ejemplo.
- 20 Especialmente se ha encontrado que el producto de degradación en promedio es más corto para las enzimas GH10 analizadas en esta memoria en comparación con las enzimas GH11. Esto mejora la disminución del efecto de la viscosidad.
- 25 Además, una ventaja adicional de las xilanasas GH10 de la presente invención (a diferencia de muchas xilanasas GH11) es que no se ven afectadas por los inhibidores de la xilanasas de trigo, p.ej., inhibidores proteicos tipo TAXI, que se producen el trigo.
- Una ventaja de la presente invención es que mejora la separación de gluten-almidón del trigo.
- La enzima de la presente invención es particularmente eficaz para aumentar el rendimiento de un sujeto o de mejorar la digestibilidad de una materia prima en una alimentación y/o para mejorar la eficacia de la alimentación en un sujeto.
- 30 **Material que contiene xilano**
- La xilanasas de la presente invención (o composición que comprende la xilanasas de la presente invención) se puede usar para degradar cualquier material que contiene xilano.
- En esta memoria se describe que el material que contiene xilano es cualquier material vegetal que comprende arabinoxilano.
- 35 El material que contiene xilano es cualquier material vegetal que comprende arabinoxilano insoluble (AXinsol).
- En una realización, el material que contiene xilano es un pienso o un componente alimentario.
- En una realización, el material que contiene xilano es un material a base de grano (que incluye granos completos o granos parciales o granos malteados, p. ej., cebada malteada). Cuando el método se refiere a la producción de biocombustibles (p. ej., producción de bioetanol) entonces, preferiblemente, el material que contiene xilano es un material a base de grano.
- 40 En otra realización, el material que contiene xilano puede ser una malta o papilla de cebada, o cebada malteada o combinaciones de estas.
- En una realización adicional más, el material que contiene xilano puede ser una harina de cereal (p. ej., harina de trigo, avena, centeno o cebada). Cuando el método se refiere a un proceso de separación de gluten-almidón, preferiblemente el material que contiene xilano es una harina de cereal (p. ej., harina de trigo, avena, centeno o cebada).
- 45 **Ruptura o degradación**
- La enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención o como se describe en esta memoria se puede usar para romper (degradar) AXinsol o AXsol o productos de degradación de AXinsol.
- 50 El término "ruptura" o "degradación" es sinónimo de hidrólisis.

Solubilización/Degradación

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

5 Este método se puede describir en esta memoria como solubilización de pentosano o solubilización de arabinoxilano o solubilización de AXinsol o degradación de AXinsol.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para degradar (o romper) arabinoxilano insoluble (AXinsol). Esto también se puede denominar solubilización de arabinoxilano insoluble y/o solubilización de pentosanos.

En una realización adicional de la presente invención, el método se refiere a degradar (p. ej., romper) polímeros derivados de la degradación de arabinoxilanos insolubles.

10 Arabinoxilano (AX)

El término "arabinoxilanos" (AX) como se usa en esta memoria significa un polisacárido que consiste en un esqueleto de xilano (unidades de xilosa unidas 1,4) con L-arabinofuranosa (L-arabinosa en su forma de anillo de 5 átomos) unidos aleatoriamente mediante enlaces $1\alpha\rightarrow 2$ y/o $1\alpha\rightarrow 3$ a las unidades de xilosa a través de la cadena. El arabinoxilano es una hemicelulosa que se encuentra tanto en las paredes celulares primarias como secundarias de las plantas. El arabinoxilano se puede encontrar en el salvado de granos como trigo, mazorca (maíz), centeno y cebada.

El arabinoxilano (AX) se encuentra en estrecha asociación con la pared celular de la planta, donde actúa como un pegamento que une varios bloques de construcción de la pared y del tejido celular de la planta, lo que le confiere resistencia y rigidez estructural.

20 El término "pentosano" como se usa en esta memoria es cualquiera de un grupo de carbohidratos que producen pentosas en la hidrólisis completa.

Dado que la xilosa y la arabinosa (los constituyentes de arabinoxilanos) son ambas pentosas, los arabinoxilanos se clasifican generalmente como pentosanos.

El AX es la principal fracción de Polisacárido Sin Almidón (NSP) en varias de las materias primas de alimentación más importantes, que incluyen trigo y maíz.

25 Su abundancia, ubicación dentro del material vegetal y estructura molecular hacen que el AX tenga un impacto negativo severo en la digestibilidad del alimento, reduciendo eficazmente el valor nutricional de las materias primas en las que está presente. Esto hace al AX un importante factor anti-nutricional, que reduce la eficiencia de la producción animal.

30 Además, el AX puede tener un impacto negativo severo cuando se intenta romper el material vegetal, por ejemplo, en procesos como la elaboración de cerveza, malteado, fabricación de biocombustibles, reduciendo eficazmente la cantidad de sustrato accesible en el material vegetal crudo.

Los AX también pueden contener cantidades sustanciales de agua (lo que se puede denominar como capacidad de retención de agua)- esto puede producir que los arabinoxilanos solubles den lugar a viscosidad (alta)- lo que es una desventaja en muchas aplicaciones.

35 El término "hemicelulosa"- como se usa en esta memoria- quiere decir los componentes polisacáridos de las paredes celulares de las plantas distintos de la celulosa. El término "hemicelulosa" como se usa en esta memoria puede significar polisacáridos en las paredes celulares de la planta que se pueden extraer con soluciones alcalinas diluidas. La hemicelulosa comprende casi un tercio de los carbohidratos del tejido vegetal leñoso. La estructura química de las hemicelulosas consiste en largas cadenas de una variedad de pentosas, hexosas y sus correspondientes ácidos urónicos. Las hemicelulosas se pueden encontrar en frutas, tallos de plantas y cáscaras de grano. El xilano es un ejemplo de un pentosano que consiste en unidades de D-xilosa con enlaces $1\beta\rightarrow 4$.

Arabinoxilano insoluble en agua (AXinsol)

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

45 En el trigo, el AXinsol puede representar el 6,3% de la materia seca. En el salvado de trigo y DDGS de trigo, el AXinsol puede representar aproximadamente el 20,8% o el 13,4% de la materia seca (p/p).

En el centeno, el AXinsol puede representar el 5,5% de la materia seca.

En el maíz, el AXinsol puede representar el 3,5-6% (p. ej., el 5,1%) de la materia seca. En el DDGS de maíz, el AXinsol puede representar el 10-20% (p. ej., el 12,6%) de la materia seca.

El AXinsol origina el atrapamiento de nutrientes en la alimentación. Grandes cantidades de nutrientes bien digeribles, como el almidón y las proteínas, permanecen englobados en agrupaciones de material de la pared celular o unidos a las cadenas laterales del AX. Estos nutrientes atrapados no estarán disponibles para la digestión y posterior absorción en el intestino delgado.

5 Arabinoxilano soluble en agua (AXsol)

El arabinosilano soluble en agua (AXsol) también conocido como arabinosilano extraíble con agua (WE-AX) puede causar problemas en la producción de biocombustibles y/o malteado y/o elaboración de cerveza y/o en la alimentación, ya que pueden producir un aumento de la viscosidad debido a la capacidad de unión de agua del AXsol.

10 En la alimentación, el AXsol puede tener un efecto anti-nutricional, especialmente en monogástricos, ya que produce un aumento considerable de la viscosidad del contenido intestinal, originado por la extraordinaria capacidad de unión de agua del AXsol. El aumento de la viscosidad puede afectar a la digestión del alimento y el uso de nutrientes ya que puede prevenir la mezcla adecuada del alimento con enzimas digestivas y sales biliares y/o ralentiza la disponibilidad y absorción de nutrientes y/o estimula la fermentación en el intestino posterior.

15 En el trigo, el AXsol puede representar el 1,8% de la materia seca. En el salvado de trigo y el DDGS de trigo, el AXsol puede representar aproximadamente el 1,1% o el 4,9% de la materia seca (p/p).

En el centeno, el AXsol puede representar el 3,4% de la materia seca.

En la cebada, el AXsol puede representar el 0,4-0,8% de la materia seca.

En el maíz, el AXsol puede representar el 0,1-0,4% (p. ej., 0,1%) de la materia seca. En el DDGS de maíz, el AXsol puede representar el 0,3-2,5% (p. ej., 0,4%) de la materia seca.

20 Sin embargo, además, a la cantidad de AXsol presente en el material vegetal, cuando una xilanasa solubiliza el AXinsol en el material vegetal, este puede liberar pentosanos y/u oligómeros que contribuyen al contenido de AXsol del material vegetal.

Una ventaja significativa de las xilanasas descritas en esta memoria es que tienen la capacidad de solubilizar AXinsol sin aumentar la viscosidad. Actualmente se cree que no se forman los productos de alto peso molecular.

25 Una ruptura del AXsol puede disminuir la viscosidad.

Una ruptura del AXsol puede liberar nutrientes.

Viscosidad

30 La presente invención se puede usar para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o para reducir la viscosidad en cualquier proceso en el que la capacidad de unión al agua del AXsol provoque un aumento indeseable de la viscosidad.

La presente invención se refiere a asegurar que la viscosidad no aumente y/o a reducir la viscosidad rompiendo (degradando) AXsol o rompiendo (degradando) los polímeros y/u oligómeros producidos por solubilización del AXinsol.

35 Sin querer limitarse a la teoría, al ser capaz de romper (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (p. ej., oligómeros) obtenidos por la disolución del AXinsol, se puede evitar un aumento no deseado de la viscosidad y/o se puede obtener una reducción de la viscosidad. El término "eficazmente" como se usa en esta memoria significa que la enzima es capaz de degradar los polímeros (p. ej., oligómeros) que se forman por solubilización del AXinsol más rápido que la velocidad con la que se degrada el AXinsol (o se solubiliza).

Reducir la viscosidad tiene ventajas en muchas aplicaciones según se indica en esta memoria.

40 Se describió originalmente un ensayo in vitro que intenta imitar el entorno en el intestino delgado de un pollo por Bedford & Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). El ensayo consiste en una incubación en dos etapas del alimento primero a pH bajo con pepsina seguido de incubación con pancreatina a pH neutro. Se acepta generalmente que la viscosidad del sobrenadante después de la incubación final se correlaciona con la viscosidad creada in vivo en pollos de engorde.

45 No incrementar la viscosidad y/o una reducción en la viscosidad según se indica en esta memoria para aplicaciones de alimentación quiere decir que la adición de la xilanasa dará lugar a una viscosidad sin cambios o menor medida por el método descrito en el Ejemplo 7. Por sin cambios se entiende que el valor medido, que es el promedio de tres repeticiones, se encuentra dentro de dos desviaciones estándar del valor medido para una muestra de trigo sin la adición de xilanasa.

50 Se puede medir la viscosidad usando los siguientes dispositivos: Viscoanalizador Rápido (RVA) (p. ej., en el procesamiento de bioetanol) y viscosímetro Haake VT550 (Thermofisher) (p. ej., en el procesamiento de almidón de

gluten-trigo). Ambos dispositivos pueden monitorizar los perfiles de viscosidad de procesos de combustible de etanol y los procesos de separación de almidón de trigo, de los que se muestran las condiciones experimentales en el Ejemplo 8 y 9, respectivamente.

5 En la presente invención, se puede calcular una reducción en la viscosidad comparando una muestra que comprende la xilanasas de la presente invención (o indicada en esta memoria) en comparación con otra muestra comparable sin la xilanasas de la presente invención (o indicada en esta memoria).

10 La comparación de los perfiles de reducción de la viscosidad de la xilanasas de la presente invención con los de la(s) xilanasas(s) de referencia del mercado demuestra el rendimiento de la enzima. El objetivo es mejorar el rendimiento de la enzima en comparación con el punto de referencia del mercado. La(s) enzima(s) de referencia para aplicaciones individuales se proporcionan en los ejemplos a continuación.

La enzima de referencia para aplicaciones de alimentación es Econase®XT.

La enzima de referencia para el procesamiento de bioetanol es Xylathin™.

La enzima de referencia para la separación de almidón de trigo-gluten es Shearzyme Plus™.

En una realización de la presente invención, las xilanasas indicadas en esta memoria son reductoras de la viscosidad.

15 En general, el trigo (u otro cereal) se muele primero en seco para separar el salvado y el germen del endospermo, que se muele para hacer harina. Esta harina de endospermo se fracciona aún más mediante un proceso de separación de almidón de trigo en varias cadenas de productos de valor comercial variable. El objetivo principal es producir un grado refinado de almidón A, que consiste en gránulos lenticulares grandes de 15-40 µm. La segunda cadena de almidón B consiste en gránulos de almidón menos purificados que son esféricos y pequeños (1-10 µm). (C.C. Maningat, P. A. Seib, S.D. Bassi, K.S. Woo, G.D. Lasater, Capítulo 10 del libro "Starch" (2009) 441-451, *Wheat starch: production, properties, modification and uses*). El almidón de trigo aislado constituye el material de partida para la producción de almidón modificado con aplicaciones tanto en aplicaciones alimentarias como no alimentarias. El gluten vital es el tercer producto de valor añadido en los procesos de separación del trigo. La vitalidad del gluten de trigo está determinada por la capacidad de formar redes viscoelásticas necesarias para la panificación. El gluten vital encapsula el dióxido de carbono formado por la preparación de la masa durante la cocción y, como consecuencia, aumenta el volumen del pan. (Anne van der Borght, Hans Goesaert, Wim S. Veraverbeke, Jan A. Delcour, *Journal of Cereal Science* 41 (2005) 221-237, *Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved*), por lo tanto, se usa para enriquecer harinas para la elaboración del pan, para lograr productos de pan mejorados. Otros mercados para el gluten incluyen como un aditivo en productos vegetarianos, carne, pescado o aves, que incluyen los de la industria de alimentos para mascotas; en cereales de desayuno; o en salsa de soja. Debido a su termoplasticidad y buenas propiedades de formación de película, el gluten también se usa en mercados no alimentarios como adhesivos. (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey, C.W. Wrigley, *Trends in Food Science & Technology* 17 (2006) 82-90, *Wheat-gluten uses and industry needs*).

20

25

30

35 Las xilanasas indicadas en esta memoria se pueden usar para reducir la viscosidad (o no aumentar la viscosidad) en procesos para separar harina de cereal (p. ej., harina de trigo, avena, centeno o cebada) en almidón y fracciones de gluten y para mejorar la separación degradando oligosacáridos que impiden la aglomeración del gluten.

40 La viscosidad del mosto y la viscosidad de la papilla de cebada y de la malta de cebada en la elaboración de cerveza y malteado pueden producir desventajas durante la elaboración de cerveza y/o el malteado. La presente invención se refiere a reducir la viscosidad (o no aumentar la viscosidad) del mosto, papilla de cebada, malta de cebada o una combinación de estos.

Alimentación o pienso

La enzima o composición de aditivo alimentario de la presente invención se puede usar como – o en la preparación de- un alimento.

El término "alimento" se usa de manera sinónima en esta memoria con "pienso".

45 Preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano de la presente invención es un pienso, o un constituyente de un pienso, o un componente alimentario.

El alimento puede estar en forma de una solución o como un sólido o como un semi-sólido – dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

50 Cuando se usa como -o en la preparación de- un alimento- como un alimento funcional- la enzima o composición de la presente invención se puede usar junto con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente activo nutricionalmente aceptable.

En una realización preferida, la enzima o composición de aditivo alimentario de la presente invención se mezcla con un componente alimentario para formar un pienso.

5 El término “componente alimentario” como se usa en esta memoria significa todo o parte del pienso. Parte del pienso puede significar un constituyente del pienso o más de un constituyente del pienso, p. ej., 2 o 3 o 4. En una realización, el término “componente alimentario” abarca una premezcla o constituyentes de premezcla.

Preferiblemente el alimento puede ser un forraje, o una premezcla de este, un compuesto alimentario, o una premezcla de este. En una realización, la composición de aditivo alimentario de acuerdo con la presente invención se puede mezclar con un componente alimentario, un componente de alimento compuesto o a una premezcla de un alimento compuesto o a un forraje, un componente de forraje, o una premezcla de un forraje.

10 El término “forraje”, como se usa en esta memoria, significa cualquier alimento que se proporciona a un animal (en lugar de que el animal tenga que buscarlo por sí mismo). El forraje abarca plantas que han sido cortadas.

El término forraje incluye ensilaje, alimentos prensados y en pellets, aceites y raciones mixtas, y también granos brotados y legumbres.

15 El forraje se puede obtener de una o más plantas seleccionadas de: maíz (mazorca), alfalfa (alfalfa), cebada, loto de los prados, brassica, Chau moellier, col rizada, colza (canola), colinabo (sueco), nabo, trébol, trébol híbrido, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco, festuca, espiguilla, mijo, avenas, sorgo, sojas, árboles (brotes de árbol podado para heno de árbol), trigo y legumbres.

20 El término “alimento compuesto” significa un alimento comercial en forma de una comida, un pellet, nueces, pastel o una torta. Los alimentos compuestos se pueden mezclar a partir de varias materias primas y aditivos. Estas mezclas se formulan de acuerdo con los requerimientos específicos del animal objetivo.

Los alimentos compuestos pueden ser alimentos completos que proporcionan todos los nutrientes diarios requeridos, concentrados que proporcionan una parte de la ración (proteína, energía) o suplementos que solo proporcionan micronutrientes adicionales, como minerales y vitaminas.

25 Los ingredientes principales usados en alimentos compuestos son los granos alimentarios, que incluyen maíz, trigo, harina de canola, harina de colza, altramuza, semillas de soja, sorgo, avenas y cebada.

De forma adecuada, una premezcla como se menciona en esta memoria, puede ser una composición compuesta de microingredientes como vitaminas, minerales, conservantes químicos, antibióticos, productos de fermentación y otros ingredientes esenciales. Las premezclas suelen ser composiciones adecuadas para mezclar en raciones comerciales.

30 Cualquier pienso de la presente invención puede comprender uno o más materiales seleccionados del grupo que comprende a) cereales, como granos pequeños (p. ej., trigo, cebada, centeno, avena, triticale y combinaciones de estos) y/o granos grandes como maíz o sorgo; b) subproductos de cereales, como harina de gluten de maíz, torta húmeda (particularmente torta húmeda a base de maíz), Grano Seco de Destilerías (DDG) (particularmente Grano Seco de Destilerías a base de maíz (cDDG)), Solubles de Grano Seco de Destilerías (DDGS) (particularmente Solubles de Grano Seco de Destilerías a base de maíz (cDDGS)), salvado de trigo, intermediarios de trigo, trigo pequeño, salvado de arroz, cáscaras de avena, semilla de palma y pulpa de cítricos; c) proteína obtenida de fuentes como soja, girasol, cacahuete, altramuza, guisantes, habas, algodón, canola, harina de pescado, proteína plasmática seca, harina de carne y hueso, proteína de patata, suero de leche, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidas de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.

40 En una realización, el pienso comprende o consiste en maíz, DDGS (como cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de estos.

En una realización, el componente alimentario puede ser maíz, DDGS (p. ej., cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de estos.

En una realización, el pienso comprende o consiste en maíz, DDGS (como cDDGS) o una combinación de estos.

En una realización, el componente alimentario puede ser maíz, DDGS (como cDDGS) o una combinación de estos.

45 Un pienso de la presente invención puede contener al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50% o al menos un 60% en peso de harina de maíz y soja o maíz y soja con toda la grasa, o harina de trigo o harina de girasol.

Un pienso de la presente invención puede contener de aproximadamente 5 a aproximadamente 40%, de DDGS de maíz. Para aves – el pienso en promedio puede contener de aproximadamente 7 a 15% de DDGS de maíz. Para porcino (cerdos) – el pienso puede contener en promedio de 5 a 40% de DDGS de maíz.

50 Un pienso de la presente invención puede contener maíz como único grano, en cuyo caso el pienso puede comprender de aproximadamente 35% a aproximadamente 80% de maíz.

En piensos que comprenden granos mezclados, p. ej., que comprenden maíz y trigo por ejemplo, el pienso puede comprender al menos un 10% de maíz.

5 Además o como alternativa, un pienso de la presente invención puede comprender al menos un material alimentario con alto contenido en fibra y/o al menos un subproducto de al menos un material alimentario de alto contenido en fibra para proporcionar un pienso de alto contenido en fibra. Ejemplos de materiales alimentarios con alto contenido en fibra incluyen: trigo, cebada, centeno, avena, subproductos de cereales, como harina de gluten de maíz, alimento de gluten de maíz, torta húmeda, Grano Seco de Destilerías (DDG), Solubles de Grano Seco de Destilerías (DDGS), salvado de trigo, intermediarios de trigo, trigo pequeño, salvado de arroz, cáscaras de arroz, cáscaras de avena, semilla de palma y pulpa de cítricos. Algunas fuentes de proteínas también pueden considerarse de alto contenido en fibra: 10 proteína obtenida de fuentes como girasol, altramuza, habas y algodón.

En una realización, el pienso de la presente invención comprende al menos un material de alto contenido en fibra y/o al menos un subproducto de al menos un material alimentario de alto contenido en fibra seleccionado del grupo que consiste en Solubles de Grano Seco de Destilerías (DDGS) – particularmente cDDGS, torta húmeda, Grano Seco de Destilerías (DDG) – particularmente cDDG, salvado de trigo y trigo, por ejemplo.

15 En una realización, el pienso de la presente invención comprende al menos un material de alto contenido en fibra y/o al menos un subproducto de al menos un material alimentario de alto contenido en fibra seleccionado del grupo que consiste en Solubles de Grano Seco de Destilerías (DDGS) – particularmente cDDGS, salvado de trigo y trigo, por ejemplo.

20 En la presente invención, el alimento puede ser uno o más de los siguientes: un alimento compuesto y una premezcla, que incluye pellets, nueces o torta (ganado); un cultivo o residuo de cultivo: maíz, soja, sorgo, avena, copra de cebada, paja, cascarilla, deshechos de remolacha azucarera; harina de pescado; harina de carne y hueso; melazas; torta de aceite y torta prensada; oligosacáridos; plantas forrajeras conservadas; ensilaje; algas marinas; semillas y granos, ya sean enteros o preparados por trituración, molienda, etc.; granos brotados y legumbres; extracto de levadura.

25 El término “alimento” en la presente invención abarca en algunas realizaciones alimento para mascotas. Un alimento para mascotas es un material vegetal o animal destinado para el consumo de mascotas, como alimentos para perros o gatos. El alimento para mascotas, como la comida para perros y gatos, puede estar en forma seca, como croquetas para perros, o en forma húmeda enlatada. El alimento para gatos puede contener al aminoácido taurina.

30 El término “alimento” en la presente invención abarca en algunas realizaciones alimento para peces. Un alimento para peces normalmente contiene macro nutrientes, elementos traza y vitaminas necesarias para mantener a los peces cautivos con buena salud. El alimento para peces puede estar en forma de escamas, pellets o tabletas. Las formas en pellets, algunas de las cuales se hunden rápidamente, se usan a menudo para peces de mayor tamaño o especies que se alimentan en el fondo. Algunos alimentos para peces también contienen aditivos, como beta caroteno u hormonas sexuales para realzar artificialmente el color de los peces ornamentales.

35 El término “alimento” en la presente invención abarca en algunas realizaciones alimento para pájaros. Un alimento para pájaros incluye alimentos que se usan tanto en comederos de aves como para alimentar a las aves de compañía. Por lo general, el alimento para aves comprende una variedad de semillas, pero también puede abarcar el sebo (carne de res o grasa de cordero).

40 Como se usa en esta memoria, el término “contactado” se refiere a la aplicación indirecta o directa de la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención al producto (p. ej., el alimento). Los ejemplos de los métodos de aplicación que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, tratar el producto en una material que comprende la composición de aditivo alimentario, la aplicación directa mezclando la composición de aditivo alimentario con el producto, rociar la composición de aditivo alimentario sobre la superficie del producto o sumergir el producto dentro de una preparación de la composición de aditivo alimentario.

45 En una realización, la composición de aditivo alimentario de la presente invención se mezcla preferiblemente con el producto (p. ej., pienso). Alternativamente, la composición de aditivo alimentario se puede incluir en la emulsión o ingredientes crudos de un pienso.

Para algunas aplicaciones, es importante que la composición se haga disponible en o sobre la superficie de un producto a ser afectado/tratado. Esto permite que la composición imparta una o más de las siguientes características favorables: beneficios en el rendimiento.

50 La enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se puede aplicar para entremezclar, recubrir y/o impregnar un producto (p. ej., pienso o ingredientes crudos de un pienso) con una cantidad controlada de dicha enzima.

55 Preferiblemente, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención será térmicamente estable al tratamiento con calor hasta aproximadamente 70°C; hasta aproximadamente 85°C o hasta aproximadamente 95°C. El tratamiento térmico se puede realizar hasta aproximadamente 1 minuto; hasta aproximadamente 5 minutos, hasta aproximadamente 10 minutos; hasta aproximadamente 30 minutos; hasta

- aproximadamente 60 minutos. El término térmicamente estable significa que al menos aproximadamente el 75% de la enzima que estaba presente/activa en el aditivo antes de calentar a la temperatura específica todavía está presente/activa después de que se enfría a temperatura ambiente. Preferiblemente, al menos un 80% de la enzima que está presente y activa en el aditivo antes de calentar a la temperatura específica todavía está presente/activa después de que se enfría a temperatura ambiente.
- 5 En una realización particularmente preferida, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se homogeneiza para producir un polvo.
- En una realización alternativa preferida, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se formula en gránulos como se describe en el documento WO2007/044968 (denominados como gránulos TPT) o el documento WO1997/016076 o el documento WO1992/012645.
- 10 En otra realización preferida, cuando la composición de aditivo alimentario se formula en gránulos, los gránulos comprenden una sal de barrera hidratada recubierta sobre el núcleo de proteína. La ventaja de dicho recubrimiento salino es la tolerancia térmica mejorada, la estabilidad de almacenamiento mejorada y la protección frente a otros aditivos alimentarios que de otra manera tienen un efecto adverso en la enzima.
- 15 Preferiblemente, la sal usada para el recubrimiento salino tiene una actividad de agua mayor que 0,25 o humedad constante mayor que el 60% a 20°C.
- Preferiblemente, el recubrimiento salino comprende un Na₂SO₄.
- El método de preparación de una enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención también puede comprender la etapa adicional de hacer pellets el polvo. El polvo se puede mezclar con otros componentes conocidos en la técnica. El polvo, o mezcla que comprende el polvo, se puede pasar a la fuerza a través de un troquel y se cortan las hebras resultantes en gránulos adecuados de longitud variable.
- 20 Opcionalmente, la etapa de hacer pellets puede incluir un tratamiento con vapor, o etapa de acondicionamiento, antes de la formación de los pellets. La mezcla que comprende el polvo se puede colocar en un acondicionador, p. ej., un mezclador con inyección de vapor. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura específica, como de 60 a 100°C, las temperaturas típicas serían 70°C, 80°C, 85°C, 90°C o 95°C. El tiempo de residencia puede ser variable desde segundos a minutos e incluso horas. Como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.
- 25 Se entenderá que la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención es adecuada para la adición a cualquier material alimentario apropiado.
- 30 El experto en la técnica entenderá que diferentes animales requieren diferentes piensos e incluso el mismo animal puede requerir diferentes piensos dependiendo del propósito para el que se cría el animal.
- Opcionalmente, el pienso puede también contener minerales adicionales como, por ejemplo, calcio y/o vitaminas adicionales.
- Preferiblemente, el pienso es una mezcla de harina de maíz y soja.
- 35 En una realización, preferiblemente el alimento no es un alimento para mascotas.
- En otro aspecto, se proporciona un método para producir un pienso. El pienso se produce típicamente en fábricas de piensos en las que las materias primas se muelen primero a un tamaño de partícula adecuado y luego se mezclan con los aditivos apropiados. El pienso se puede entonces producir como una papilla o pellets; el último típicamente implica un método mediante el que la temperatura se eleva a un nivel objetivo y luego el alimento se pasa a través de un troquel para producir pellets de un tamaño particular. Los pellets se dejan enfriar. Posteriormente se pueden añadir aditivos líquidos como grasa y enzima. La producción de pienso también puede implicar una etapa adicional que incluye la extrusión o expansión antes de hacer pellets – en particular mediante técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor.
- 40 El pienso puede ser un pienso para un animal monogástrico, como aves de corral (por ejemplo, pollos de engorde, ponedoras, pollos de engorde reproductores, pavo, pato, gansos, aves acuáticas) y ganado porcino (todas las categorías de edad), un rumiante como ganado (p. ej., vacas o toros (incluyendo terneros)), caballos, ovejas, una mascota (por ejemplo, perros, gatos) o peces (por ejemplo, peces agástricos, peces gástricos, peces de agua dulce como salmón, bacalao, trucha y carpa, p. ej., carpa koi, peces marinos como lubina y crustáceos como gambas, mejillones y vieiras). Preferiblemente, el pienso es para aves de corral.
- 45 Piensos a base de maíz
- En una realización preferida, el pienso puede ser un pienso a base de maíz. El término “pienso a base de maíz” como se usa en esta memoria significa un pienso que comprende o consiste en maíz (mazorca) o un subproducto de maíz.
- 50

- Preferiblemente, el pienso a base de maíz comprende maíz o un subproducto de maíz como el constituyente principal. Por ejemplo, el pienso a base de maíz puede comprender al menos un 35% de maíz o un subproducto de maíz, como al menos un 40% de maíz o un subproducto de maíz, como al menos un 50% de maíz o un subproducto de maíz, como al menos un 60% de maíz o un subproducto de maíz, como al menos un 70% de maíz o un subproducto de maíz, como al menos un 80% de maíz o un subproducto de maíz, como al menos un 90% de maíz o un subproducto de maíz, por ejemplo un 100% de maíz o un subproducto de maíz.
- En algunas realizaciones, el pienso a base de maíz puede comprender maíz o un subproducto de maíz como un constituyente menor; en cuyo caso el pienso se puede suplementar con maíz o un subproducto de maíz. A modo de ejemplo, solo el pienso puede comprender, por ejemplo, trigo suplementado con maíz o un subproducto de maíz.
- Cuando el maíz o el subproducto de maíz es un constituyente menor del pienso, el maíz o el subproducto de maíz es al menos un 5%, preferiblemente al menos un 10%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 30% del pienso.
- Para evitar dudas, el término “maíz” como se usa en esta memoria es sinónimo de mazorca, p.e j., *Zea mays*.
- En una realización, el subproducto de maíz puede ser Solubles de Granos Secos de Destilería de maíz (cDDGS) o torta húmeda de maíz o Granos Secos de Destilería de maíz (DDG) o harina de gluten de maíz o alimento de gluten de maíz o combinaciones de estos.
- En una realización, preferiblemente el material que contiene arabinoxilano de la presente invención comprende un subproducto de maíz, como Solubles de Granos Secos de Destilería de maíz (cDDGS) o torta húmeda de maíz o Granos Secos de Destilería de maíz (DDG) o harina de gluten de maíz o alimento de gluten de maíz o combinaciones de estos.
- Pienso a base de trigo
- En una realización preferida, el pienso puede ser un pienso a base de trigo. El término “pienso a base de trigo” como se usa en esta memoria significa un pienso que comprende o consiste en trigo o subproducto de trigo.
- Preferiblemente, el pienso a base de trigo comprende trigo o un subproducto de trigo como el constituyente principal. Por ejemplo, el pienso a base de trigo puede comprender al menos un 40% de trigo o un subproducto de trigo, como al menos un 60% de trigo o un subproducto de trigo, como al menos un 80% o un subproducto de trigo, como al menos un 90% de trigo o un subproducto de trigo, por ejemplo un 100% de trigo o un subproducto de trigo.
- En algunas realizaciones, el pienso a base de trigo puede comprender trigo o un subproducto de trigo como un constituyente menor; en cuyo caso el pienso se puede suplementar con trigo o un subproducto de trigo. A modo de ejemplo, solo el pienso puede comprender, por ejemplo, trigo suplementado con trigo o un subproducto de trigo.
- Cuando el trigo o el subproducto de trigo es un constituyente menor del pienso, el trigo o el subproducto de trigo es al menos un 5%, preferiblemente al menos un 10%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 30% del pienso.
- En una realización, el subproducto de trigo puede ser salvado de trigo, intermediarios de trigo, fibras de trigo, por ejemplo.
- El salvado es la capa dura externa del grano y consiste en aleurona y pericarpio. Junto con el germen, es una parte integral de los granos enteros y, a menudo, se produce como un subproducto de la molienda en la producción de granos refinados. Cuando se retira el salvado de los granos, los granos pierden una parte de su valor nutricional. El salvado está presente en y se puede moler a partir de cualquier grano de cereal, incluyendo arroz, maíz (mazorca), trigo, avena, cebada y mijo. El salvado es particularmente rico en fibra dietética y ácidos grasos esenciales y contiene cantidades significativas de almidón, proteína, vitaminas y minerales dietéticos.
- Los intermediarios de trigo son partículas gruesas y finas del salvado de trigo y partículas finas de trigo pequeño, germen de trigo, harina de trigo y desperdicios de la “cola del molino”.
- Los intermediarios de trigo son un subproducto intermedio económico de la alimento humano y alimentación animal. En una realización, preferiblemente el material que contiene arabinoxilano de la presente invención comprende salvado de trigo y/o intermediarios de trigo.
- Torta húmeda, Granos Secos de Destilería (DDG) y Solubles de Granos Secos de Destilería (DDGS)
- La torta húmeda, los Granos Secos de Destilería (DDG) y los Solubles de Granos Secos de Destilería (DDGS) son productos obtenidos después de la eliminación del alcohol etílico por destilación a partir de la fermentación por levadura de un grano o una mezcla de grano por métodos empleados en la industria de la destilación de grano.
- El residuo que proviene de la destilación (p. ej., que comprende agua, restos del grano, células de levadura, etc.) se separa en una parte “sólida” y una parte líquida.

La parte sólida se llama “torta húmeda” y se puede usar como alimento animal como tal.

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

Cuando la torta húmeda se seca se trata de Granos Secos de Destilería (DDG).

5 Cuando la torta húmeda se seca junto con el jarabe (solubles) se trata de Granos Secos de Destilería con Solubles (DDGS).

La torta húmeda se puede usar en operaciones lecheras y en corrales de ganado para carne.

Los DDGS secos se pueden usar en alimentos para ganado en cautividad, p. ej., alimentos lácteos, bovinos y porcinos alimentos para aves de corral.

El DDGS de maíz es un muy buena fuente de proteínas para las vacas lecheras.

10 Harina de gluten de maíz

En un aspecto, el subproducto de maíz puede ser harina de gluten de maíz (CGM).

15 CGM es un subproducto en polvo de la industria de la molienda de maíz. CGM tiene utilidad en, por ejemplo, alimentación animal. Se puede usar como una fuente económica de proteínas para alimentación como alimentos para mascotas, alimentos para ganadería y alimentos para aves de corral. Es una fuente especialmente buena del aminoácido cisteína, pero se debe equilibrar con otras proteínas para la lisina.

Composición de aditivo alimentario

La composición de aditivo alimentario de la presente invención y/o el pienso que comprende el mismo se puede usar en cualquier forma adecuada.

20 La composición de aditivo alimentario de la presente invención se puede usar en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de estas. Ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, pellets, tabletas, serrines y gránulos que se pueden humedecer, secarse por pulverización o liofilizarse. Ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuoso-orgánicas.

25 En algunas aplicaciones, las composiciones de aditivo alimentario de la presente invención se pueden mezclar con alimentos o administrar en el agua potable.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar una composición de aditivo alimentario, que comprende mezclar una xilanas como se describe en este documento con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable alimentario y (opcionalmente) envasar.

Premezcla

30 El pienso y/o composición de aditivo alimentario se puede combinar con al menos un mineral y/o al menos una vitamina. Las composiciones así derivadas se pueden denominar en esta memoria como una premezcla.

Malteado y elaboración de cerveza

La enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se puede usar en el malteado y la elaboración de cerveza.

35 Los granos de cebada contienen de 1,7 a 4,1% (p/p) de beta –glucano extraíble en agua y de 3,6 a 6,4% (p/p) de beta-glucano total (Anderson, M.A., Cook, J.A., & Stone, B.A., Journal of the Institute of Brewing, 1978, 84, 233-239; Henry, J., Journal of the Science of Food and Agriculture, 1985, 36, 1243).

Los granos de trigo contienen de 0,1 a 0,8% (p/p) de beta –glucano extraíble en agua y de 0,6 a 1,4% (p/p) de beta-glucano total (Anderson, M.A. *et al* (1978) *supra*).

40 La hidrólisis eficaz de arabinosilanos (AXsol) y de beta-glucano es importante porque tales componentes pueden estar involucrados en problemas de producción como la viscosidad del mosto (Ducroo, P. & Frelon, P.G., Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Zurich, 1989, 445; Viëtor, R.J. & Voragen, A.G.J., Journal of the Institute of Brewing, 1993, 99, 243) y de filtrabilidad y formación de turbidez (Coote, N. & Kirsop, B.H. 1976., Journal of the Institute of Brewing, 1976, 82, 34; Izawa, M., Kano, Y. & Kanimura, M. 1991. Proceedings Avimore Conference on
45 Malting, brewing and Distilling, 1990, 427).

La presente invención proporciona un método para hidrolizar arabinosilanos (p. ej., AXinsol y AXsol) durante el malteado y la elaboración de cerveza en donde los granos de trigo, granos de cebada o una combinación de estos, o porciones de los granos de trigo y/o de cebada, se mezclan con la enzima de la presente invención.

Se describe en esta memoria una composición alimentaria que es una bebida, que incluye, pero no se limita a, una bebida fermentada como una cerveza y vino, que comprende una xilanasa que comprende (o consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 15, o una variante, homólogo, fragmento o derivado de esta que tiene al menos un 75% de identidad (como al menos un 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad) con la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 15; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11 o SEQ ID N° 15 con una sustitución conservativa de al menos uno de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18, o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad (como al menos un 80%, 85%, 90%, 95% o 98% de identidad) con la SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17 o SEQ ID N° 18; o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 4 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 6 o la SEQ ID N° 12 o la SEQ ID N° 13 o la SEQ ID N° 14 o la SEQ ID N° 16 o la SEQ ID N° 17 o la SEQ ID N° 18 debido a la degeneración del código genético.

Se describe en esta memoria una composición alimentaria que es una bebida, que incluye, pero no se limita a, una bebida fermentada como cerveza y vino, que comprende una enzima xilanasa que comprende (o que consiste en) una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 3 o una variante, homólogo, fragmento o derivado de esta que tiene al menos un 98,5% de identidad (p. ej., al menos un 98,8% o 99 o 99,1 o 99,5%) con la SEQ ID N° 1 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 3, o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como la SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 6, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% de identidad (p. ej., al menos un 98%, 98,5% o 99%) con la SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 6.

En el contexto de la presente descripción, el término “bebida fermentada” se entiende que comprende cualquier bebida producida por un método que comprende un proceso de fermentación, como una fermentación microbiana, como una fermentación bacteriana y/o de levadura.

En un aspecto de la descripción, la bebida fermentada es cerveza. El término “cerveza” se entiende que comprende cualquier mosto fermentado producido por fermentación/elaboración de cerveza de un material vegetal que contiene almidón. A menudo, la cerveza se produce a partir de malta o complemento, o cualquier combinación de malta y complemento como el material vegetal que contiene almidón. Como se usa en esta memoria, el término “malta” se entiende como cualquier grano de cereal malteado, como cebada malteada o trigo.

Como se usa en esta memoria, el término “complemento” se refiere a cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar que no es malta, como malta de cebada o de trigo. Como ejemplos de complementos, se puede hacer mención de materiales que se pueden usar como una fuente de almidón como sémola de maíz común, sémola de maíz refinada, levadura molida de cerveza, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarillada, trigo, almidón de trigo, cereal torrefacto, copos de cereal, centeno, avena, maíz (mazorca), patata, tapioca, yuca y jarabes, como jarabe de maíz, jarabe de caña de maíz, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o trigo y similares.

Como se usa en esta memoria, el término “papilla” se refiere a una solución espesa acuosa de cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar como molienda, p. ej., que comprende malta de cebada triturada, cebada triturada y/u otro complemento o una combinación de estos, mezclada con agua para luego separarse en mosto y granos gastados.

Como se usa en esta memoria, el término “mosto” se refiere al licor vaciado no fermentado después de extraer la molienda durante la maceración.

Se describe en esta memoria un método para preparar una bebida fermentada como cerveza que comprende mezclar la xilanasa de la presente invención con malta o complemento.

Ejemplos de cervezas comprenden: cerveza malteada completa, cerveza elaborada bajo el “Reinheitsgebot”, cerveza inglesa, IPA, cerveza lager, cerveza bitter, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, cerveza con muy poco alcohol, cerveza ligera, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías, cerveza porter, cerveza bock, cerveza stout, licor de malta, cerveza no alcohólica, licor de malta no alcohólico y similares, pero también bebidas alternativas de cereal y malta como bebidas de malta con sabor a fruta, p. ej., con sabor cítrico, como de sabor a limón, naranja, lima o a bayas, bebidas de malta con sabor a licor, p. ej., bebidas de malta con sabor a vodka, ron o tequila, o bebidas de malta con sabor a café, como licor de malta con sabor a cafeína y similares.

Ruptura de material a base de grano, p. ej., para producción de biocombustible

La enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención o como se describe en esta memoria se puede usar para romper (degradar) AXinsol y AXsol durante el procesamiento del grano a partir de p. ej., material

a base de grano. El material a base de grano puede ser granos enteros (p. ej., granos enteros de trigo, cebada, centeno, triticale o maíz o mezclas de estos) o porciones de granos enteros o mezclas de estos.

5 En una realización, la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención o como se describe en esta memoria se puede usar para romper (degradar) AXinsol y AXsol en materiales a base de grano o granos enteros.

Para evitar dudas, los granos enteros se pueden romper mecánicamente.

El material a base de grano se puede romper o degradar a glucosa. La glucosa se puede usar posteriormente como una materia prima para cualquier proceso de fermentación, p. ej., para la producción de biocombustible (p. ej., bioetanol) y/o la producción de productos bioquímicos (p. ej., isopreno de origen biológico).

10 El material a base de grano puede ser materia prima para un proceso de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol).

15 Hoy en día la mayoría del etanol se produce a partir del grano de maíz (mazorca), que se muele, se trata con enzima amilasa para hidrolizar el almidón a azúcares, se fermenta y se destila. Si bien se ha realizado un progreso sustancial en la reducción de costos de la producción de etanol, aún quedan desafíos sustanciales, aún se necesitan técnicas mejoradas para reducir el coste de las materias primas para biocombustibles para la producción de etanol. Por ejemplo, en la producción de etanol a base de grano la degradación de arabinoxilanos puede aumentar la accesibilidad del almidón.

La presente invención proporciona una xilanasa para usar en la ruptura de hemicelulosas, p. ej., arabinoxilano – particularmente AXinsol y AXsol.

20 A modo solamente de ejemplo, en la industria europea del alcohol combustible, son materias primas comunes los granos pequeños como trigo, cebada y centeno, el maíz se usa principalmente en EE.UU. El trigo, cebada y centeno contienen, junto con el almidón, altos niveles de polímeros de polisacárido de no almidón (NSP), como celulosa, beta-glucano y hemicelulosa.

25 La proporción en la que están representados los diferentes NSPs difiere para cada materia prima. La tabla a continuación muestra las diferentes cantidades de NSPs en trigo, cebada y centeno en comparación con algunas otras materias primas.

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

	Maíz	Trigo	Centeno	Cebada		Avena	
				Con cáscara	Sin cáscara	Con cáscara	Sin cáscara
Beta-glucano	1	8	16	42	42	28	41
Celulosa	22	17-20	15-16	43	10	82	14
NCP soluble y no soluble ¹	75	89-99	116-136	144	114	150	113
NSP total	97	107-119	132-152	186	124	232	116
¹ Polisacáridos no celulósicos: pentosanos, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas							

30 Los NSPs pueden dar alta viscosidad a las papillas de grano debido a sus altas capacidades de unión de agua. La alta viscosidad tiene un impacto negativo en la producción de etanol ya que limitará la concentración de sólido que se puede usar en el macerado y reducirá la eficiencia energética del proceso. Además, las hemicelulosas residuales presentes a lo largo del proceso pueden contribuir a la obstrucción en los intercambiadores de calor y en el equipo de destilación. El mayor impacto de la alta viscosidad se observa cuando la papilla se enfría a la temperatura de fermentación (32°C). Esto explica que se necesite reducir la viscosidad en cualquier parte del proceso antes de la etapa de enfriamiento.

35 En una realización de la presente invención el método para degradar material a base de grano comprende mezclar la xilanasa como se describe en esta memoria tan pronto como sea posible en el proceso de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol), p. ej., preferiblemente durante la mezcla del material a base de grano al comienzo del proceso. Una ventaja de añadir las xilanasas como se describe en esta memoria en una etapa temprana en el proceso es que las enzimas rompen la viscosidad inicial.

En una realización de la presente invención, el método para degradar el material a base de grano comprende mezclar la xilanasa como se describe en esta memoria antes o durante la sacarificación, fermentación o una combinación de estas.

5 En una realización de la presente invención, el método para degradar el material a base de grano comprende mezclar la xilanasa como se describe en esta memoria durante la licuefacción (p. ej., una etapa de alta temperatura que sigue a la mezcla).

Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a reducir la viscosidad cuando se degradan los materiales a base de grano, p. ej., en el proceso de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol).

10 Los beneficios de usar las xilanasas descritas en esta memoria de reducir la viscosidad cuando se degradan los materiales a base de grano, p. ej., en los procesos de producción de biocombustible (p. ej., bioetanol) son múltiples:

- Se puede usar una papilla de sustancia seca superior en el proceso
- Se pueden obtener un contenido de sólidos superior del jarabe final
- Mejor transferencia de calor, menor requerimiento de energía
- Obstrucción del evaporador reducida dando lugar a la reducción de los costos de limpieza

15 • Rendimientos de etanol final aumentados

• Calidad de DDGS (subproducto) mejorada

• Mejor separación entre la parte sólida y la líquida durante la separación por destilación (después de la destilación). La menor viscosidad aumenta la eficacia de separación.

20 Una ventaja significativa adicional de la presente invención es que el uso de la xilanasa descrita en esta memoria en la producción de biocombustible también puede dar como resultado la mejora de (sub)productos de ese proceso como la torta húmeda, Granos Secos de Destilería (DDG) o Granos Secos de Destilería con Solubles (DDGS). Por lo tanto, una ventaja de la presente invención es, ya que la torta húmeda, DDG y DDGS son (sub)productos de la producción de biocombustible (p. ej., bioetanol), el uso de la presente invención puede dar como resultado una calidad mejorada de estos (sub)productos. Por ejemplo, los arabinoxilanos en los (sub)productos se pueden disolver fácilmente durante el proceso de producción de biocombustible.

25

Separación de gluten-almidón del cereal (p. ej. trigo)

La enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención o como se describe en esta memoria se puede usar para romper (degradar) AXinsol y AXsol durante la separación de almidón y de gluten de trigo.

30 Después de la separación inicial del salvado de trigo y el germen del endospermio, se aplica el fraccionamiento de la harina de endospermio de trigo en fracciones de almidón y de gluten industrialmente a gran escala para obtener almidón de calidad A y subproductos de almidón B y gluten vital.

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

35 Además, también se producen subproductos de almidón B y gluten vital. Cada producto individual después se procesa adicionalmente para suplementar o modificar las características del producto alimentario según las necesidades del mercado.

40 Hay varios procesos de separación de trigo usados por la industria descritos en la bibliografía. Estos procesos industriales difieren principalmente en las formas de las mezclas harina-agua presentadas al equipo de fraccionamiento (centrífuga, hidrociclón o criba) o en las condiciones de reacción inicial como temperatura y aplicación de fuerza de cizallamiento (Abdulvahit Sayaslan, Lebensm.-Wiss. U.-Technol. 37 (2004) 499-515, Wetmilling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods).

45 En el método para separar una harina de cereal (p. ej., harina de trigo) en fracciones de almidón y gluten, el método comprende mezclar una harina de cereal (p. ej., harina de trigo), agua y una xilanasa. La harina de cereal, agua y xilanasa se pueden mezclar simultáneamente o de modo secuencial. En algunas realizaciones, la harina de cereal (p. ej., harina de trigo) y agua se pueden mezclar antes de mezclar con la xilanasa.

En general, la harina de cereal (p. ej., harina de trigo) o bien se mezcla en una masa o amasada, que varía entre 35 a 63% de sólidos Secos, a temperaturas de ~20-45°C. La mezcla se procesa después adicionalmente ya sea por:

1) dejar la mezcla reposar durante algún tiempo (~30 minutos) y secuencialmente lavar el almidón de la mezcla usando una criba, centrífuga o hidrociclón para separar la leche de almidón del gluten, o

2) aplicar fuerza de cizallamiento a la mezcla, diluyendo opcionalmente la mezcla aún más y separando después la harina de trigo mediante un hidrociclón o una centrífuga decantadora de 2 o 3 fases.

El término “sólidos secos” como se usa en esta memoria significa los sólidos totales (disueltos y no disueltos) de una solución espesa (en %) en peso seco.

5 En una realización de la presente invención, el método o el uso según se reivindica puede incluir las etapas de mezclar la harina de trigo para formar una masa o amasar entre 35-63% de sólidos secos, a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 45°C y separar el almidón del gluten.

El método de la presente invención puede comprender además:

10 a) dejar reposar la mezcla durante aproximadamente 30 minutos y lavar secuencialmente el almidón de la mezcla usando ya sea una criba, una centrífuga o un hidrociclón para separar la leche de almidón del gluten; o

b) aplicar una fuerza de cizallamiento a la mezcla y además diluir opcionalmente la mezcla, separar el almidón del gluten usando un hidrociclón o una centrífuga decantadora de 2 o 3 fases.

15 La presente invención proporciona para mejorar la separación del almidón y el gluten añadiendo xilanasas como se describe en esta memoria de forma adecuada durante la etapa inicial de mezcla de la harina y el agua en los diferentes procesos descritos anteriormente usados para la separación del almidón de trigo. La separación se mejora añadiendo xilanasas durante la etapa inicial de mezcla debido a la reducción de la viscosidad y a la hidrólisis de AXsol y/o AXinsol que interfiere con las partículas de gluten. Degradando estos poli- y oligosacáridos, se aumenta la aglomeración del gluten, mejorando el rendimiento del gluten. (S.A. Frederix, C.M. Courtin, J.A. Delcour, J. Cereal Sci. 40 (2004) 41-49, Substrate selectivity and inhibitor sensitivity affect xylanase functionality in wheat flour gluten-starch separation).

20 Una ventaja de la presente invención es que da como resultado unos rendimientos más altos de almidón A y/o mejor calidad del gluten (p. ej., mejor calidad de gluten vital).

Una ventaja de la presente invención es que mejora la separación de gluten-almidón de trigo.

25 Una de las formas para evaluar la calidad del gluten es monitorizando la aglomeración de gluten. Cuando se aplica una cierta cantidad de fricción a través de amasar la masa o de mezclar la masa, las partículas de gluten tienden a agregarse en partículas más grandes que forman un entramado polimérico, llamado “gluten vital”. El “gluten vital” se puede añadir a los productos alimentarios para mejorar las propiedades de productos horneados como fuerza de la masa, duración y volumen del pan (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey and C.W. Wrigley; Wheat-gluten uses and industry needs; Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 82-90).

30 En la industria de la panadería, la calidad y cantidad de gluten en una harina de trigo se determina mediante el ensayo estándar ICC N°. 155 (AACC 38-12) usando una Glutomatic. En este dispositivo, se forma una masa a partir de harina de trigo (10,0 g) mezclada con una pequeña cantidad de solución de NaCl al 2% (4,2 – 4,8 ml). Después de 20 segundos de etapa de mezcla, la masa se amasa de forma continua mientras se lava durante 5 minutos con una solución de NaCl al 2% a temperatura ambiente (~22°C) bombeada a través de la copa de mezcla a un flujo de ~70 ml/minuto. Durante la etapa de lavado, se recoge el agua de lavado que contiene almidón y las partículas de gluten
35 forman un balón de gluten dentro del soporte del tamiz Glutomatic.

La calidad del gluten se mide evaluando la aglomeración del gluten. Esto se hace centrifugando el balón de gluten en una centrífuga especial que contiene un tamiz pequeño. Las partículas de gluten que pasan este tamiz se pesan (gluten pequeño) y se pesa la cantidad total de gluten. Se calcula el índice de gluten mediante (gluten húmedo total – gluten húmedo pequeño)/gluten húmedo total. Cuanto más se mejore la aglomeración del gluten menor será la fracción de gluten pequeño y mayor será el valor del índice. Un alto índice de gluten, con un máximo teórico del 100%, indica una alta calidad del balón de gluten.
40

Otro valor para cuantificar la cantidad de gluten es el rendimiento de gluten seco (%). Este valor se calcula dividiendo los gramos de gluten seco total por la cantidad total de harina seca que se usó en el experimento. Cuanto más gluten seco se recupere, mejor será la separación. Este ensayo industrial está actualmente en adaptación para simular un
45 proceso de separación de la masa usado en la industria.

Dosificaciones

Preferiblemente, la xilanasas está presente en el material que contiene xilano (p. ej., pienso) en el intervalo de aproximadamente 500 XU/kg a aproximadamente 16.000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), más preferiblemente aproximadamente 750 XU/kg de alimento a aproximadamente 8000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), preferiblemente aproximadamente 1500 XU/kg de alimento a aproximadamente 3000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), preferiblemente aproximadamente 2000 XU/kg de alimento a aproximadamente 2500 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento) e incluso más preferiblemente aproximadamente 1000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento) a aproximadamente 4000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento).
50

- En una realización, la xilanasa está presente en el material que contiene xilano (p. ej., pienso) a más de aproximadamente 500 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente más de aproximadamente 600 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente más de aproximadamente 700 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente más de
- 5 aproximadamente 800 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente más de aproximadamente 900 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente más de aproximadamente 1000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente más de aproximadamente 2000 XU/kg, adecuadamente más de aproximadamente 2500 XU/kg, adecuadamente más de aproximadamente 3000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento).
- 10 En una realización, la xilanasa está presente en el material que contiene xilano (p. ej., pienso) a una concentración de entre aproximadamente 2000 XU/kg a aproximadamente 2500 XU/kg.
- En una realización, la xilanasa está presente en el material que contiene xilano (p. ej., pienso) a menos de aproximadamente 16.000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente menos de aproximadamente 8000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente menos de
- 15 aproximadamente 7000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente menos de aproximadamente 6000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente menos de aproximadamente 5000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento), adecuadamente menos de aproximadamente 4000 XU/kg de material que contiene xilano (p. ej., alimento).
- 20 Preferiblemente, la xilanasa puede estar presente en una composición de aditivo alimentario en un intervalo de aproximadamente 100 XU/g a aproximadamente 320.000 XU/g de composición, más preferiblemente aproximadamente 300 XU/g de composición a aproximadamente 160.000 XU/g de composición e incluso más preferiblemente aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 50.000 XU/g de composición e incluso más preferiblemente aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 40.000 XU/g de composición.
- 25 En una realización, la xilanasa está presente en la composición de aditivo alimentario a más de aproximadamente 100 XU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 200 XU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 300 XU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 400 XU/g de composición, adecuadamente más de aproximadamente 500 XU/g de composición.
- 30 En una realización, la xilanasa está presente en la composición de aditivo alimentario a menos de aproximadamente 320.000 XU/g de composición, adecuadamente a menos de aproximadamente 160.000 XU/g de composición, adecuadamente a menos de aproximadamente 50.000 XU/g de composición, adecuadamente a menos de aproximadamente 40.000 XU/g de composición, adecuadamente a menos de aproximadamente 30.000 XU/g de composición.
- 35 La actividad xilanasa se puede expresar en unidades de xilanasa (XU) medidas a pH 5,0 con AZCL-arabinóxilano (arabinóxilano de trigo entrecruzado con azurina, tabletas de Xylazyme, Megazyme) como sustrato. La hidrólisis por la *endo*-(1-4)- β -D-xilanasa (xilanasa) produce fragmentos de colorante solubles en agua y la velocidad de liberación de estos (aumento de la absorbancia a 590 nm) se puede relacionar directamente con la actividad enzimática. Las unidades de xilanasa (XU) se determinan en relación con un estándar de enzima (Danisco Xylanase, disponible en Danisco Animal Nutrition) en unas condiciones de reacción estándar, que son 40°C, 5 min de tiempo de reacción en tampón Mcllvaine, pH 5,0.
- 40 La actividad xilanasa de la enzima estándar se determina como cantidad de grupos de extremos de azúcar reductor de un sustrato de avena-espelta-xilano por min a pH 5,3 y 50°C. Los grupos de extremo de azúcar reductor reaccionan con ácido 3,5-dinitrosalicílico y se puede medir la formación del producto de reacción como un incremento en la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica en relación con una curva estándar de xilosa (equivalentes de azúcar reductor). Una unidad de xilanasa (XU) es la cantidad de enzima estándar que libera 0,5 μ mol de equivalentes de azúcar reductor por min a pH 5,3 y 50°C.
- 45 En una realización, la enzima se clasifica adecuadamente usando la clasificación E.C. anterior y la clasificación E.C. designa una enzima que tiene esa actividad cuando se prueba en el ensayo descrito en esta memoria para determinar 1 XU.
- 50 Preferiblemente, la actividad xilanasa está presente en la etapa de mezcla de un proceso de separación de almidón en la masa o amasado en el intervalo de aproximadamente 0,01 kg/MT DS de masa o amasado a aproximadamente 0,60 kg/MT DS, más preferiblemente aproximadamente 0,05 kg/MT DS a aproximadamente 0,45 kg/MT DS de masa o amasado e incluso más preferiblemente aproximadamente 0,10 kg/MT DS a aproximadamente 0,25 kg/MT DS de masa o amasado.
- 55 En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación de almidón de trigo), la xilanasa se puede dosificar en el intervalo de aproximadamente 0,019 g de proteína/MT DS de harina de trigo (que es equivalente a 0,019 mg/kg DS) a aproximadamente 119 g de proteína /MT DS de harina de trigo (que es equivalente a 119 mg/kg DS – donde DS significa contenido de sólidos secos y MT significa tonelada métrica).

En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación de almidón de trigo), la xilanasas se puede dosificar a aproximadamente 1,19 g de proteína /MT DS de harina de trigo (que es equivalente a aproximadamente 1,19 mg/kg DS) – donde DS significa contenido de sólidos secos y MT significa tonelada métrica.

5 En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación de almidón de trigo), la xilanasas se puede dosificar en el intervalo de aproximadamente 9 a aproximadamente 120.000 unidades/kg de harina de trigo, adecuadamente entre aproximadamente 500-2400 unidades/kg de harina de trigo, adecuadamente entre aproximadamente 900-1200 unidades/kg de harina de trigo (en donde 1 unidad se define como la cantidad de enzima requerida para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 3).

10 En algunas realizaciones (particularmente en el material a base de grano en degradación), la xilanasas se puede dosificar en el intervalo de aproximadamente 0,29 g/proteína/MT DS de trigo (que es equivalente a 0,29 mg/kg DS) a aproximadamente 0290 g/proteína /MT DS de trigo (que es equivalente a 290 mg/kg DS):

En algunas realizaciones (particularmente en el material a base de grano en degradación), la xilanasas se puede dosificar a 2,9 g/proteína/MT DS de trigo (que es equivalente a 2,9 mg/kg DS).

15 En algunas realizaciones (particularmente en el material a base de grano en degradación), la xilanasas se puede dosificar en el intervalo de aproximadamente 22 a aproximadamente 285.000 unidades/kg, adecuadamente aproximadamente 1100 a aproximadamente 5700 unidades/kg, adecuadamente aproximadamente 2200 a aproximadamente 2850 unidades/kg (en donde 1 unidad se define como la cantidad de enzima requerida para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 3).

20 La enzima y/o composición que comprende la enzima de acuerdo con la presente invención se puede diseñar para una sola dosis o se puede diseñar para usar (p. ej., alimentación) diariamente.

25 La cantidad óptima de la enzima y/o composición que comprende la enzima para usarse en la presente invención dependerá del producto a tratar y/o el método de poner en contacto el producto con la composición y/o el uso previsto para el mismo.

La cantidad de enzima usada en las composiciones debe ser una cantidad suficiente para ser eficaz.

30 La cantidad de enzima usada en las composiciones debe ser una cantidad suficiente para ser eficaz y mantenerse suficientemente eficaz en, por ejemplo, mejorar la realización de unos productos alimentarios para animales alimentados que contienen dicha composición. Este periodo de tiempo para la efectividad se debe entender hasta al menos el tiempo de utilización del producto (p. ej., composición de aditivo alimentario o alimento que contiene los mismos).

Formulación

En una realización, la enzima se puede formular como un líquido, un polvo seco o un gránulo.

35 El polvo seco o los gránulos se pueden preparar por medios conocidos por los expertos en la técnica, como, en un recubridor de lecho fluido de rociado superior, en un espray de pulsador Wurster o mediante granulación de tambor (p. ej., granulación de alto cizallamiento), extrusión, recubrimiento en bandeja o en un mezclador de microingredientes.

Para algunas realizaciones, la enzima se puede recubrir, por ejemplo encapsulada.

En una realización, el recubrimiento protege la enzima del calor y se puede considerar un termoprotector.

40 En una realización, la composición de aditivo alimentario se formula como un polvo seco o gránulos como se describe en el documento WO2007/044968 (referido como gránulos TPT) o los documentos WO1997/016076 o WO1992/012645.

45 En una realización, la composición de aditivo alimentario se puede formular como un granulado para composiciones alimentarias que comprenden: un núcleo; un ingrediente activo y al menos un recubrimiento, el ingrediente activo del granulado que retenga al menos el 50% de actividad, al menos un 60% de actividad, al menos un 70% de actividad, al menos un 80% de actividad después de condiciones seleccionadas de una o más de a) un proceso de fabricación de pellets alimentarios, b) un proceso de pretratamiento de alimento calentado a vapor, c) almacenamiento, d) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla que no es de pellets y, e) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla a base de alimento o una premezcla alimentaria que comprende al menos un componente seleccionado de minerales traza, ácidos orgánicos, azúcares reductores, vitaminas, cloruro de colina y compuestos que dan como resultado una mezcla a base alimentaria o premezcla alimentaria ácida o básica.

50 Con respecto al gránulo, al menos un recubrimiento puede comprender un material hidratante de humedad que constituye al menos un 55% p/p del granulo; y/o al menos un recubrimiento puede comprender dos recubrimientos. Los dos recubrimientos pueden ser un recubrimiento hidratante de humedad y un recubrimiento de barrera de

humedad. En algunas realizaciones, el recubrimiento hidratante de humedad puede estar entre el 25% y el 60% p/p del gránulo y el recubrimiento hidratante de barrera puede estar entre el 2% y el 15% p/p del gránulo. El recubrimiento hidratante de humedad se puede seleccionar de sales inorgánicas, sacarosa, almidón y maltodextrina y el recubrimiento de barrera de humedad se puede seleccionar de polímeros, gomas, suero y almidón.

- 5 El gránulo se puede producir usando un proceso de fabricación de pellets de alimento y el proceso de pretratamiento alimentario se puede llevar a cabo entre 70°C y 95°C por hasta varios minutos, como entre 85°C y 95°C.

- 10 En una realización, la composición de aditivo alimentario se puede formular como un gránulo para alimento animal que comprende: un núcleo; un ingrediente activo, el agente activo del gránulo que retiene al menos un 80% de actividad después del almacenamiento y después del proceso de fabricación de pellets calentado a vapor donde el gránulo es un ingrediente; un recubrimiento de barrera de humedad; y un recubrimiento hidratante de humedad que es al menos un 25% p/p del gránulo, el gránulo que tiene una actividad de agua de menos de 0,5 previo al proceso de fabricación de pellets calentado al vapor.

- 15 El gránulo puede tener un recubrimiento de barrera de humedad seleccionado de polímeros y gomas y el material hidratante de humedad puede ser una sal orgánica. El recubrimiento hidratante de humedad puede estar entre el 25% y el 45% p/p del gránulo y el recubrimiento de barrera de humedad puede estar entre el 2% y el 10% p/p del gránulo.

El gránulo se puede producir usando un proceso de fabricación de pellets calentado al vapor lo que se puede llevar a cabo entre 85°C y 95°C hasta varios minutos.

En algunas realizaciones, la enzima se puede diluir usando un diluyente, como un polvo de almidón, caliza o similar.

- 20 En una realización, la enzima o composición que comprende la enzima está en una formulación líquida adecuada para el consumo preferiblemente tal consumo líquido contiene uno o más de los siguientes: un tampón, sal, sorbitol y/o glicerol.

En otra realización, la enzima o composición que comprende la enzima se puede formular aplicando, p. ej., por rociado, la(s) enzima(s) sobre un vehículo sustrato, como trigo molido por ejemplo.

- 25 En una realización, la enzima o composición que comprende la enzima de acuerdo con la presente invención se puede formular como una premezcla. A modo de ejemplo solamente, la premezcla puede comprender uno o más componentes alimentarios, como uno o más minerales y/o una o más vitaminas.

- 30 En una realización, la enzima para usar en la presente invención se formula con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado de al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón, Na₂SO₄, talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbiato, glicerol, sacarosa, propilén glicol, 1,3-propano diol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, matabisulfito, formato y mezclas de estos.

Envasado

En una realización, se envasa la enzima y/o composición que comprende la misma (p. ej., composición de aditivo alimentario) y/o premezcla y/o alimento o pienso de acuerdo con la presente invención.

- 35 En una realización preferida, se envasa la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o pienso en una bolsa, como una bolsa de papel.

En una realización alternativa, la composición de aditivo alimentario y/o premezcla y/o alimento o pienso se puede sellar en un contenedor. Se puede usar cualquier contenedor adecuado.

Formas

- 40 La enzima o composición que comprende la enzima (p. ej., la composición de aditivo alimentaria) de la presente invención y otros componentes y/o el pienso que comprende la misma se puede usar en cualquier forma adecuada.

- 45 La enzima o composición que comprende la misma (p. ej., composición de aditivo alimentario) de la presente invención se puede usar en la forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de estas. Ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, pellets, tabletas, píldoras, cápsulas, óvulos, soluciones o suspensiones, serrines y gránulos que se pueden humedecer, secarse por rociado o liofilizarse. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuoso-orgánicas.

La composición que comprende la enzima puede contener agentes aromatizantes o colorantes para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, sostenida, pulsada o controlada.

- 50 A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se usa en un sólido. p. ej., en forma de pellet, también puede contener uno o más de: se pueden incluir excipientes como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico,

carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina; desintegrantes como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y ciertos salicilatos complejos; aglutinantes de granulación como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia; agentes lubricantes como estearato de magnesio, ácido esteárico, gliceril behenato y talco.

5 Ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para usar en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilén glicoles, propilén glicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos petroetrales, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

10 Los excipientes preferidos para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilén glicoles de alto peso molecular.

Para suspensiones acuosas y/o elixires, la composición de la presente invención se puede combinar con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, materia colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o suspensores y con diluyentes como agua, propilén glicol y glicerina y combinaciones de estos.

15 Sujeto

El término “sujeto”, como se usa en esta memoria, significa un animal al que se va a administrar o se ha administrado una composición de aditivo alimentario de acuerdo con la presente invención o un pienso que comprende dicha composición de aditivo alimentario de acuerdo con la presente invención.

El término “sujeto” como se usa en esta memoria significa un animal.

20 En una realización, el sujeto es un mamífero, ave, pez o crustáceo que incluye por ejemplo ganado o un animal doméstico (p. ej., una mascota).

En una realización el “sujeto” es ganado.

25 El término “ganado”, como se usa en esta memoria, se refiere a cualquier animal de granja. Preferiblemente, el ganado es uno o más de los rumiantes, como reses (p. ej., vacas o toros (que incluyen terneros)), animales monogástricos, como aves de corral (que incluyen pollos de engorde, pollos y pavos), cerdos (que incluyen lechones), aves, animales acuáticos como peces, peces agástricos, peces gástricos, peces de agua dulce como salmón, bacalao, trucha y carpa, p. ej., carpa koi, peces marinos como lubina y crustáceos como camarones, mejillones y vieiras), caballos (que incluyen los caballos de carrera), ovejas (que incluyen corderos).

En otra realización, el “sujeto” es un animal doméstico o mascota o un animal mantenido en un ambiente zoológico.

30 El término “animal doméstico o mascota o animal mantenido en un entorno zoológico” como se usa en esta memoria se refiere a cualquier animal relevante que incluye caninos (p. ej., perros), felinos (p. ej., gatos), roedores (p. ej., cobayas, ratas, ratones), aves, peces (que incluyen peces de agua dulce y peces marinos) y caballos.

Rendimiento

35 Como se usa en esta memoria, el “rendimiento animal” se puede determinar por la eficacia de la alimentación y/o aumento de peso del animal y/o por la relación de conversión de la alimentación y/o por la digestibilidad de un nutriente en un alimento (p. ej., digestibilidad de aminoácidos) y/o energía digerible o energía metabolizable en un alimento y/o por la retención de nitrógeno y/o por la capacidad de los animales para evitar los efectos negativos de la enteritis necrótica y/o por la respuesta inmune del sujeto.

40 Preferiblemente el “rendimiento animal” se determina por la eficacia de la alimentación y/o por la ganancia de peso del animal y/o por la relación de conversión de la alimentación.

45 Por “rendimiento animal mejorado” se entiende que hay una mayor eficacia de alimentación y/o una ganancia de peso aumentada y/o una relación de conversión de alimentación reducida y/o una digestibilidad mejorada de nutrientes o energía en un alimento y/o por una retención mejorada de nitrógeno y/o por una respuesta inmune mejorada en el sujeto que se originan del uso de la composición de aditivo alimentario de la presente invención en el alimento en comparación con el alimento que no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

Preferiblemente, por “rendimiento animal mejorado” se entiende que hay un aumento de la eficacia del alimento y/o un aumento de ganancia de peso y/o una relación de conversión de la alimentación reducida.

50 Como se usa en esta memoria, el término “eficacia de alimentación” se refiere a la cantidad de ganancia de peso por unidad de alimento cuando el animal se alimenta ad-libitum o una cantidad específica de alimento durante un periodo de tiempo.

Por “eficacia de alimentación aumentada” se entiende que el uso de una composición de aditivo alimentario de acuerdo con la presente invención en la alimentación da como resultado una ganancia de peso aumentada por unidad de ingesta de alimento en comparación con un animal alimentado sin que esté presente dicha composición de aditivo alimentario.

5 Relación de conversión de alimentación (FCR)

Como se usa en esta memoria, el término “relación de conversión de alimento” se refiere a la cantidad de alimento dado como alimento a un animal para aumentar el peso del animal en una cantidad específica.

Una relación de conversión de alimentación mejorada significa una relación de conversión de alimentación más baja.

10 Por “relación de conversión de alimentación más baja” o “relación de conversión de alimentación mejorada” se entiende que el uso de una composición de aditivo alimentario en la alimentación da como resultado que se requiera una cantidad menor para alimentar a un animal para aumentar el peso del animal en una cantidad específica en comparación con la cantidad de alimento requerida para incrementar el peso del animal en la misma cantidad cuando el alimento no comprende dicha composición de aditivo alimentario.

Digestibilidad de nutrientes

15 La digestibilidad de nutrientes como se usa en esta memoria significa la fracción de un nutriente que desaparece del tracto gastrointestinal o un segmento específico del tracto gastrointestinal, p. ej., el intestino delgado. La digestibilidad de los nutrientes se puede medir como la diferencia entre lo que se administra al sujeto y lo que sale en las heces del sujeto, o entre lo que se administra al sujeto y lo que queda en el bolo intestinal en un segmento específico del tracto gastrointestinal, p. ej., el íleon.

20 La digestibilidad de nutrientes como se usa en esta memoria se puede medir por la diferencia entre la ingesta de un nutriente y el nutriente excretado por medio de la recogida de excreciones durante un periodo de tiempo; o con el uso de un marcador inerte que no se absorbe por el animal y permite al investigador calcular la cantidad de nutriente que desapareció en todo el tracto gastrointestinal o en un segmento del tracto gastrointestinal. Dicho marcador inerte puede ser dióxido de titanio, óxido crómico o ceniza insoluble en ácido. La digestibilidad se puede expresar como un porcentaje del nutriente en el alimento o como unidades de masa de nutriente digerible por unidades de masa de nutriente en el alimento.

La digestibilidad de nutrientes como se usa en esta memoria abarca la digestibilidad del almidón, digestibilidad de las grasas, digestibilidad de las proteínas y digestibilidad de los aminoácidos.

30 La digestibilidad como se usa en esta memoria significa la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta de las heces o la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta del bolo intestinal restante en un segmento específico del tracto gastrointestinal del animal, p. ej., el íleon. La energía metabolizable como se usa en esta memoria se refiere a la energía metabolizable aparente y significa la energía bruta del alimento consumido menos la energía bruta contenida en las heces, orina y productos gaseosos de la digestión. La digestibilidad de la energía y la energía metabolizable se pueden medir como la diferencia entre la ingesta de energía bruta y la energía bruta excretada en las heces o el bolo intestinal presente en un segmento específico del tracto gastrointestinal usando los mismos métodos para medir la digestibilidad de los nutrientes con las correcciones apropiadas para la excreción de nitrógeno para calcular la energía metabolizable del alimento.

Combinación con otros componentes

40 La enzima de la presente invención (o la xilanasas tal como se describe en esta memoria) se puede usar en combinación con otros componentes.

En una realización, la enzima de la presente invención (o la xilanasas tal como se describe en esta memoria) se puede usar en combinación con un probiótico o un microbiano de alimentación directa (DFM), p. ej., una bacteria de alimentación directa.

45 La combinación de la presente invención comprende la enzima de la presente invención (o la xilanasas tal como se describe en esta memoria o una composición que comprende la enzima, p. ej., una composición de aditivo alimentario) y otro componente que es adecuado para el consumo humano o animal y es capaz de proporcionar un beneficio médico o fisiológico al consumidor.

En una realización, el “otro componente” puede ser una o más enzimas adicionales (p. ej., enzimas alimentarias adicionales o enzimas de elaboración de cerveza o malteado o enzimas de separación de gluten-almidón del trigo).

50 Enzimas adicionales adecuadas para usar en la presente invención pueden ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4); celiobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91); β-glucosidasas (E.C. 3.2.1.21); celulasas (E.C. 3.2.1.74); liquenasas (E.C. 3.1.1.73); lipasas (E.C. 3.1.1.3); lípido acetiltransferasas (generalmente clasificadas como (E.C. 2.3.1.x); fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5); fitasas (p. ej., 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8); alfa-amilasas (E.C. 3.2.1.1); otras xilanasas

(E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73); glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3); proteasas (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serín proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o mananasas (p. ej., una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).

5 En una realización (particularmente para aplicaciones alimentarias) el otro componente puede ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una amilasa (que incluye α -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y γ -amilasas (E.C. 3.2.1.3); y/o una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serín proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)).

10 En una realización (particularmente para aplicaciones alimentarias) el otro componente puede ser una combinación de una amilasa (p. ej., α -amilasa (E.C. 3.2.1.1)) y una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62)).

En una realización (particularmente para aplicaciones alimentarias) el otro componente puede ser una β -glucanasa, p. ej., una endo-1,3(4)- β -glucanasas (E.C. 3.2.1.6).

En una realización (particularmente para aplicaciones alimentarias) el otro componente pueden ser unas mananasas (p. ej., una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).

15 En una realización (particularmente para aplicaciones alimentarias) el otro componente puede ser una lipasa lipasa (E.C. 3.1.1.3), una lípido acetiltransferasa (generalmente clasificada como E.C. 2.3.1.x) o una fosfolipasa (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), adecuadamente una lipasa (E.C. 3.1.1.3).

20 En una realización (particularmente para aplicaciones alimentarias) el otro componente puede ser una proteasa (p. ej., subtilisina E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serín proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)).

En una realización el componente adicional puede ser un estabilizante o un emulsionante o un aglutinante o un vehículo o un excipiente o un diluyente o un desintegrante.

El término “estabilizante” como se usa en esta memoria se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (p. ej., un producto alimentario) cambie a lo largo del tiempo.

25 El término “emulsionante” como se usa en esta memoria se refiere a un ingrediente (p. ej., un ingrediente alimentario) que previene la separación de emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gota, contenida dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite en agua, donde la gota o fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua en aceite, donde el agua se convierte en la fase dispersa y la fase continua es el aceite. Las espumas, que son gas en líquido, y las suspensiones, que son sólido en líquido, también se pueden estabilizar mediante el uso de emulsionantes.

30 Como se usa en esta memoria, el término “aglutinante” se refiere a un ingrediente (p. ej., un ingrediente alimentario) que se une al producto juntos a través de una reacción física o química. Durante la “gelificación” por ejemplo, se absorbe el agua, proporcionando un efecto aglutinante. Sin embargo, los aglutinantes pueden absorber otros líquidos, como aceites, manteniéndolos dentro del producto. En el contexto de la presente invención, los aglutinantes se usarían típicamente en productos sólidos o de baja humedad, por ejemplo, productos para hornear: pasteles, donuts, pan y otros. Ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.

35 Los “vehículos” significan materiales adecuados para administración de la enzima e incluyen cualquier material conocido en la técnica como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante o similar, que no es tóxico y que no interacciona con cualquier componente de la composición de manera perjudicial.

40 En esta memoria se describe un método para preparar una composición (p. ej., una composición de aditivo alimentario) que comprende mezclar una enzima de la presente invención con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado de al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o algún componente de trigo, sacarosa, almidón, Na₂SO₄, talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbiato, glicerol, sacarosa, propilén glicol, 1,3-propano diol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formato y mezclas de estos.

Ejemplos de “excipientes” incluyen uno o más de: celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico, glicina, almidón, azúcar de la leche y polietilén glicoles de alto peso molecular.

50 Ejemplos de “desintegrantes” incluyen uno o más de: almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata y tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos. Ejemplos de “diluyentes” incluyen uno o más de: agua, etanol, propilén glicol y glicerina y combinaciones de estos.

Los otros componente se pueden usar simultáneamente (p. ej., cuando están en una mezcla juntos o incluso cuando se distribuyen mediante diferentes rutas) o de manera secuencial (p. ej., se pueden distribuir mediante diferentes rutas) a la xilanasa de la presente invención.

5 Preferiblemente, cuando la composición de aditivo alimentario de la presente invención se mezcla con otro(s) componente(s), el DFM se mantiene viable.

En una realización, la composición de aditivo alimentario de acuerdo con la presente invención preferiblemente no comprende cromo o cromo orgánico.

En una realización, la composición de aditivo alimentario de acuerdo con la presente invención preferiblemente no contiene glucanasa.

10 En una realización, la composición de aditivo alimentario de acuerdo con la presente invención preferiblemente no contiene ácido ascórbico.

Aislado

15 En un aspecto, la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico o enzima de acuerdo con la presente invención preferiblemente está en una forma aislada. El término "aislado" significa que la secuencia, enzima o ácido nucleico está al menos sustancialmente libre de al menos un componente con el que la secuencia, enzima o ácido nucleico está naturalmente asociado en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza. La secuencia, enzima o ácido nucleico de la presente invención se puede proporcionar en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia podría estar de lo contrario asociada. Por lo tanto, por ejemplo, debe estar sustancialmente libre de uno o más moléculas de polipéptidos y/o de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

20 Purificado

En un aspecto, preferiblemente la secuencia, enzima o ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está en una forma purificada. El término "purificado" significa que el componente dado está presente a un alto nivel. El componente es, de forma deseable, el componente predominante presente en una composición. Preferiblemente, está presente a un nivel de al menos aproximadamente el 90%, o al menos aproximadamente el 95% o al menos aproximadamente el 98%, dicho nivel se determina en base a su peso seco/peso seco con respecto a la composición total bajo consideración.

25 Secuencia de nucleótidos

El alcance de la presente invención abarca secuencias de nucleótidos que codifican proteínas que tienen las propiedades específicas como se define en esta memoria.

30 El término "secuencia de nucleótidos" como se usa en esta memoria se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos y variante, homólogos, fragmentos y derivados de esta (como porciones de estas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser de cadena doble o de cadena sencilla ya sea que represente la cadena sentido o la antisentido.

35 El término "secuencia de nucleótidos" en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferiblemente significa ADN, más preferiblemente secuencia de ADNc que codifica la presente invención.

40 En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos cuando se refiere a y cuando se abarca por el alcance *per se* de la presente invención no incluye la secuencia de nucleótidos nativa de acuerdo con la presente invención cuando está en su ambiente natural y cuando está ligada a su(s) secuencia(s) naturalmente asociadas que está/están también en su/sus ambiente(s) natural(es). Para facilitar la referencia, llamaremos a esta realización preferida la "secuencia de nucleótidos no nativa". En este respecto, el término "secuencia de nucleótidos nativa" significa una secuencia de nucleótidos completa que está en su ambiente nativo y cuando está operativamente ligada a un promotor completo con el que está naturalmente asociado, dicho promotor está también en su ambiente nativo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención se puede aislar y/o purificar después de la expresión de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo. Preferiblemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención se puede expresar por una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo pero en donde la secuencia de nucleótidos no está bajo el control del promotor con el que está naturalmente asociado dentro de ese organismo.

50 Típicamente, la secuencia de nucleótidos abarcada por el alcance de la presente invención se prepara usando técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos se puede sintetizar, en su totalidad o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers MH et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

Preparación de la secuencia de nucleótidos

5 Se puede identificar y/o aislar y/o purificar una secuencia de nucleótidos que codifica ya sea una proteína que tiene propiedades específicas como se define en esta memoria o una proteína que es adecuada para modificación a partir de cualquier célula u organismo que produce dicha proteína. Se conocen bien en la técnica varios métodos para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias de nucleótidos. A modo de ejemplo, se pueden usar técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia una vez que se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

10 A modo de ejemplo adicional, se puede construir una biblioteca de ADN genómico y/o de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la enzima. Si se conoce la secuencia de aminoácidos de la enzima, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos marcadas y usarlas para identificar clones que codifican la enzima a partir de bibliotecas genómicas preparadas a partir del organismo. Alternativamente, se puede usar una sonda de oligonucleótido marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen de enzima conocido para identificar clones que codifican la enzima. En el último caso, se usan condiciones de hibridación y de lavado de baja astringencia.

15 Alternativamente, se pueden identificar clones que codifican la enzima insertando fragmentos de ADN genómico dentro de un vector de expresión, como un plásmido, transformando la bacteria negativa para la enzima con la biblioteca de ADN genómico resultante y después poner en placas las bacterias transformadas sobre placas de agar que contienen un sustrato para la enzima (es decir, maltosa), permitiendo así que se identifiquen los clones que expresan la enzima.

20 En aún una alternativa adicional, se puede preparar sintéticamente la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima mediante métodos estándar establecidos, p. ej., el método fosoroamidita descrito por Beucage S.L. et al., (1981) Tetrahedron Letters 22, p 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984) EMBO J. 3, p 801-805. En el método fosoroamidita se sintetizan los oligonucleótidos, p. ej., en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se anillan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

25 La secuencia de oligonucleótidos pueden ser de origen genómico y sintético mezcla, de origen sintético y de ADNc mezcla o de origen genómico y de ADNc mezcla, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado) de acuerdo con técnicas estándar. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia de nucleótidos completa. La secuencia de ADN se puede preparar también mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en el documento de EE.UU. 4.683.202 o en Saiki R K et al., (Science (1988) 239, págs. 487-491).

Secuencias de aminoácidos

30 El alcance de la presente invención también abarca secuencias de aminoácidos de enzimas que tienen las propiedades específicas como se define en esta memoria.

Como se usa en esta memoria, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo con el término "enzima".

35 La secuencia de aminoácidos se puede preparar/aislar a partir de una fuente adecuada o se puede hacer sintéticamente o se puede preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos cuando se refiere a o cuando se abarca por el alcance *per se* de la presente invención no es una enzima nativa. En este respecto, el término "enzima nativa" significa una enzima completa que está en su ambiente nativo y cuando se ha expresado por su secuencia de nucleótidos nativa.

40 Identidad de secuencia u homología de secuencia

45 La presente invención también abarca el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia o de homología de secuencia con secuencia(s) de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en esta memoria o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifique dicho polipéptido (en lo sucesivo denominado una(s) "secuencia(s) homóloga(s)"). Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos del sujeto y las secuencias de nucleótidos del sujeto. Aquí, el término "homología" se puede equiparar a "identidad".

La secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de nucleótidos homóloga debería proporcionar y/o codificar un polipéptido que retenga la actividad funcional y/o aumente la actividad de la enzima.

50 En el presente contexto, en algunas realizaciones, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que puede ser al menos un 97,7% idéntica, preferiblemente al menos un 98 o 99% idéntica a la secuencia sujeto.

En algunas realizaciones, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que puede ser al menos un 85% idéntica, preferiblemente al menos un 90 o 95% idéntica a la secuencia sujeto.

Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc., como la secuencia de aminoácidos sujeto, por ejemplo. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencia.

- 5 En una realización, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que tiene una o varias adiciones, supresiones y/o sustituciones en comparación con la secuencia sujeto.

En el presente contexto, "la secuencia sujeto" se refiere a la secuencia de nucleótidos o secuencia de polipéptido/aminoácido de acuerdo con la invención.

- 10 Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia polipeptídica se determina usando la SEQ ID N° 3 como la secuencia objeto en un alineamiento de secuencia. En una realización, la secuencia polipeptídica sujeto se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 1 o SEQ ID N° 2. En una realización preferida, la secuencia polipeptídica sujeto se selecciona de la secuencia madura SEQ ID N° 3.

- 15 Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina usando la SEQ ID N° 6 como la secuencia objeto en un alineamiento de secuencia. En una realización, la secuencia sujeto para secuencias de nucleótidos se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 6. En una realización preferida, la secuencia sujeto es la secuencia SEQ ID N° 6.

Un "ácido nucleico parental" o "aminoácido parental" significa una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos que codifica o codifica el polipéptido parental, respectivamente.

- 20 En una realización, la presente invención se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en esta memoria o una proteína derivada de esta proteína (parental) mediante sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos o más aminoácidos como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

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

- 30 En una realización, la presente invención se refiere a una secuencia de nucleótidos (o génica) que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en esta memoria o que codifica una proteína derivada de esta proteína (parental) por sustitución, supresión o adición de uno o varios aminoácidos como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

- 35 En el presente contexto, en una realización se toma una secuencia homóloga o secuencia extraña para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos un 97,7% idéntica, preferiblemente al menos un 98 o un 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia sujeto).

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

- 40 Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos etc. como la secuencia sujeto. Aunque se puede considerar la homología en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

- 45 Las comparaciones de homología se pueden realizar a ojo, o más generalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de homología o el % de identidad entre dos o más secuencias.

El % de homología o el % de identidad se pueden calcular sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se comprara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo a la vez. Esto se llama un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan solo sobre un número relativamente corto de residuos.

- 50 Aunque este es un método muy simple y consistente, no tiene en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o supresión causará que los siguientes residuos de aminoácidos queden desalineados, lo que podría dar como resultado una gran reducción en el % de homología o el % de identidad cuando se realiza un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tengan en cuenta posibles inserciones y supresiones sin penalizar

excesivamente la puntuación de homología general. Esto se logra al insertar “huecos” en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan “penalización de hueco” a cada hueco que se produce en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con los menos huecos posibles – lo que refleja una mayor relación entre dos secuencias comparadas – logrará una puntuación más alta que una con muchos huecos. Los “costos afines al hueco” se usan típicamente que cargan un costo relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo siguiente al hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más usado. Por supuesto las altas penalizaciones por huecos producirán alineamientos optimizados con menor número de huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, es preferible usar los valores predeterminados cuando se usa dicho programa informático para comparaciones de secuencia.

Por lo tanto, el cálculo del máximo % de homología o % de identidad requiere, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Ejemplos de programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencia incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase Ausubel et al. 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed. –Capítulo 18), BLAST 2 (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA están disponibles para búsquedas sin conexión y con conexión (véase Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60), como por ejemplo en la herramienta de búsqueda GenomeQuest (www.genomequest.com).

Aunque el % de homología o % de identidad final se pueden medir en términos de identidad, el proceso de alineamiento en sí no suele basarse en una comparación de pares de todo o nada. En su lugar, generalmente se usa una matriz de puntuación de similitud que asigna puntuaciones a cada comparación por pares en función de la similitud química o de la distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo usada comúnmente es la matriz BLOSUM62 – la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas Vector NTI usan generalmente los valores públicos por defecto o una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministran (véase el manual de usuario para obtener más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto para el paquete Vector NTI.

Alternativamente, el porcentaje de homologías se puede calcular usando la función de alineamiento múltiple en Vector NTI (Invitrogen Corp.), basado en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el programa informático ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El programa informático normalmente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En caso de que se usen las penalizaciones de hueco al determinar la identidad de secuencia, entonces se usan preferiblemente los siguientes parámetros para alineamiento de pares:

PARA BLAST	
HUECO ABIERTO	9
EXTENSIÓN DE HUECO	2

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

En una realización, se puede usar CLUSTAL con el conjunto de la penalización de hueco y de extensión de hueco como se definió anteriormente.

De manera adecuada, se determina el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos o secuencia de proteínas sobre al menos 20 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 30 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 40 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 50 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 60 nucleótidos/aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 100 nucleótidos/aminoácidos contiguos.

De manera adecuada, se determina el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos o secuencia de proteínas sobre al menos 100 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 200 nucleótidos contiguos,

preferiblemente sobre al menos 300 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 400 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 500 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 600 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 700 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 800 nucleótidos contiguos.

5 De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar sobre toda la secuencia descrita en esta memoria.

De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar sobre toda la secuencia descrita en esta memoria como la secuencia madura, p. ej., la SEQ ID N° 6. De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar sobre toda la secuencia como se describe en esta memoria como la SEQ ID N° 6.

10 De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de proteína (aminoácidos) se determina sobre al menos 100 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 200 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 300 aminoácidos contiguos.

De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o de proteína se puede determinar sobre toda la secuencia descrita en esta memoria.

15 De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o de proteína se puede determinar sobre toda la secuencia descrita en esta memoria como la secuencia madura, p. ej., la SEQ ID N° 3. De manera adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o de proteína se puede determinar sobre toda la secuencia descrita como SEQ ID N° 3.

20 En el presente contexto, el término “secuencia de consulta” significa una secuencia homóloga o una secuencia extraña que se alinea con una secuencia sujeto con el fin de ver si está dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, dicha secuencia de consulta puede ser, por ejemplo, una secuencia de la técnica anterior o una secuencia de un tercero.

25 En una realización preferida, las secuencias se alinean mediante un programa de alineamiento global y la identidad de secuencia se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la longitud de la secuencia sujeto.

30 En una realización, el grado de identidad de secuencia entre una secuencia de consulta y una secuencia sujeto se determina mediante 1) alinear las dos secuencias mediante cualquier programa de alineamiento adecuado usando la matriz de puntuación por defecto y la penalización de hueco por defecto, 2) identificar el número exacto de coincidencias, donde una coincidencia exacta es donde el programa de alineamiento ha identificado un aminoácido o nucleótido idénticos en las dos secuencias alineadas en una posición dada del alineamiento y 3) dividir el número exacto de coincidencias exactas entre la longitud de la secuencia sujeto.

En aún una realización preferida adicional, el programa de alineamiento global se selecciona del grupo que consiste en CLUSTAL y BLAST (preferiblemente BLAST) y la identidad de secuencia se calcula identificando el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la longitud de la secuencia sujeto.

35 Las secuencias también pueden tener supresiones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Se pueden hacer sustituciones de aminoácidos deliberadas sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o de la naturaleza anfipática natural de los residuos. Por ejemplo, aminoácidos negativamente cargados incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos positivamente cargados incluyen lisina y arginina; y aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

40 Se pueden hacer sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla a continuación. Aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea se pueden sustituir el uno por el otro:

ALIFÁTICO	No polar	GAP
		ILV
	Polar – sin carga	CSTM
		NQ
Polar - cargado	DEKR	
AROMÁTICO		HFWY

La presente invención también abarca la sustitución homóloga (se usan tanto la sustitución como el reemplazo en esta memoria para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente con un residuo alternativo) que puede ocurrir, es decir, una sustitución similar como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También se puede dar la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuo a otra o alternativamente que implica la inclusión de aminoácidos no naturales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ácido diaminobutírico ornitina (en lo sucesivo denominada B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominada O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazamientos también se pueden hacer por aminoácidos no naturales incluidos: aminoácidos alfa* y alfa-disustituidos*, N-alquil aminoácidos*, ácido láctico*, derivados haluros de aminoácidos naturales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alil-glicina*, β -alanina*, ácido L- α -aminobutírico*, ácido L- γ -aminobutírico*, ácido L- α -aminobutírico*, ácido L- ϵ -aminocaproico*, ácido 7-amino heptanoico*, L-metionina sulfona#, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metílicos de fenilalanina (Phe) como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metil)*, L-Phe (4-isopropil)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrathidisoquinolina-3-carboxilo)*, ácido L-diaminocaproico# y L-Phe (4-bencil)*. Se ha utilizado la notación * para el propósito de la discusión anterior (relativa a sustitución homóloga y no homóloga) para indicar la naturaleza hidrofóbica del derivado mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrofílica del derivado, #* indica características anfipáticas.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores que se pueden insertar entre dos residuos de aminoácidos cualquiera de la secuencia, que incluye grupos alquilo como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos como residuos de glicina o β -alanina. Una forma adicional de variación que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, se entenderá bien por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se usa para referirse a los residuos de aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente de α -carbono está en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar de en el de carbono. Se conocen en la técnica los procesos para preparar péptidos en la forma peptoide, por ejemplo, Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

En una realización, la xilanasasa para usar en la presente invención puede comprender una secuencia polipeptídica mostrada como SEQ ID N°. 1, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 3 con una sustitución conservativa de al menos uno de los aminoácidos.

Adecuadamente puede haber al menos 2 sustituciones conservativas, como al menos 3 o al menos 4 o al menos 5.

Adecuadamente puede haber menos de 15 sustituciones conservativas, como menos de 12, menos de 10 o menos de 8 o menos de 5.

Las secuencias de nucleótidos para usar en la presente invención pueden incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica un número de diferentes tipos de modificación de oligonucleótidos. Estos incluyen esqueletos de metil-fosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o de polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, se debe entender que las secuencias de nucleótidos descritas en esta memoria se pueden modificar mediante cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones se pueden llevar a cabo con el fin de mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias de nucleótidos de la presente invención.

La presente invención también abarca el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias presentadas en esta memoria. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces se puede usar esa secuencia como una sonda para identificar secuencias codificadoras similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero que entran dentro del alcance de la invención se pueden obtener de varias maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en esta memoria se pueden obtener, por ejemplo, sondeando bibliotecas de ADN hechas de una gama de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Además, se pueden obtener otros homólogos y dichos homólogos y fragmentos de los mismos serán capaces en general de hibridar selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias en esta memoria. Dichas secuencias se pueden obtener sondeando bibliotecas de ADNc de otras especies animales y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden la totalidad o parte de cualquiera de las secuencias en las listas de secuencias adjuntas en condiciones de astringencia media o alta. Se aplican consideraciones similares a la obtención de homólogos de especies y variantes alélicas del polipéptido o secuencias de nucleótidos de la invención.

Las variantes y homólogos de cepa/especie se pueden obtener también usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para dirigirse a secuencias dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácido conservados dentro de las secuencias de la presente invención. Se pueden predecir secuencias conservadas, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Se pueden realizar alineamientos de secuencia usando programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se usa ampliamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

Los cebadores usados en la PCR degenerada contendrá una o más posiciones degeneradas y se usará en condiciones de astringencia inferiores que las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia única frente a secuencias conocidas.

5 Alternativamente, dichos polipéptidos se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios de secuencia de codón silencioso para optimizar las preferencias de codones para una célula huésped particular en la que se están expresando las secuencias de polinucleótidos. Se pueden desear otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

10 Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención se pueden usar para producir un cebador, p. ej., un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda p. ej., marcada con un marcaje revelador por medios convencionales usando marcajes radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos se pueden clonar dentro de vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud y también están abarcados por el término polinucleótidos de la invención como se usa en esta memoria.

15 Los polinucleótidos como polinucleótidos de ADN y sondas de acuerdo con la invención se pueden producir de forma recombinante, sintética o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También se pueden clonar mediante técnicas estándar.

20 En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, un nucleótido a la vez. Las técnicas para lograr esto usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores se pueden diseñar para que contengan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de modo que se puede clonar el ADN amplificado en un vector de clonación adecuado.

25 Numeración de aminoácidos

En la presente invención, se puede emplear una numeración específica de las posiciones de residuos de aminoácidos en las xilanasas usadas en la presente invención. Al alinear la secuencia de aminoácidos de una xilanasas de muestra con la xilanasas de la presente invención (particularmente la SEQ ID N° 3) es posible asignar un número a una posición de residuo de aminoácido en dicha xilanasas de muestra que corresponde con la posición del residuo de aminoácido o de la numeración de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID N° 3 de la presente invención.

30 Hibridación

La presente invención también abarca secuencias que son complementarias a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención o secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias de las mismas.

35 El término "hibridación" como se usa en esta memoria incluirá "el proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través del emparejamiento de bases" así como el proceso de amplificación que se lleva a cabo en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

40 La presente invención también abarca el uso de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridar con las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en esta memoria o cualquier fragmento derivado de estas.

El término "variante" también abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en esta memoria.

45 Preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar bajo condiciones astringentes (p. ej., 50°C y 0,2xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en esta memoria.

Más preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar bajo condiciones de alta astringencia (p. ej., 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en esta memoria.

50 La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (que incluye secuencias complementarias de las presentadas en esta memoria).

La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que son complementarias a secuencias que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (que incluyen secuencias complementarias a las presentadas en esta memoria).

Preferiblemente, la hibridación se analiza sobre la totalidad de las secuencias enseñadas en esta memoria.

Expresión de enzimas

5 La secuencia de nucleótidos para usar en la presente invención se puede incorporar en un vector replicable recombinante. El vector se puede usar para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de proteína/enzima, en y/o a partir de una célula huésped compatible.

Se puede controlar la expresión usando secuencias control, p.ej., secuencias reguladoras.

10 Se puede secretar la proteína producida por una célula recombinante huésped mediante expresión de la secuencia de nucleótidos o se puede contener intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usados. Las secuencias codificadoras se pueden diseñar con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificadoras de la sustancia a través de una membrana celular procariótica o eucariota.

Vector de expresión

El término "vector de expresión" significa un constructo capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferiblemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma de un organismo huésped adecuado. El término "incorporado" cubre preferiblemente la incorporación estable en el genoma.

15 La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede estar presente en un vector en el que la secuencia de nucleótidos está operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por un organismo huésped adecuado.

Los vectores para usar en la presente invención se pueden transformar en una célula huésped adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

20 La elección del vector, p. ej., un plásmido, cósmido o vector de fago dependerá a menudo de la célula huésped en la que se va a introducir.

25 Los vectores para usar en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables – como un gen que confiere resistencia a antibiótico, p. ej., resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección se puede realizar mediante co-transformación (como se describe en el documento WO91/17243).

Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o usar para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula huésped.

30 Por lo tanto, se describe en esta memoria un método para hacer secuencias de nucleótidos de la presente invención introduciendo una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible y creciendo la célula huésped en condiciones que provocan la replicación del vector.

El vector además puede comprender una secuencia de nucleótidos que permite que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

Secuencias reguladoras

35 En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos para usar en la presente invención está operativamente ligada a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, como por la célula huésped elegida. A modo de ejemplo, la presente descripción cubre un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente ligado a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

40 El término "operativamente ligado" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia reguladora "operativamente ligada" a una secuencia codificadora se liga de tal manera que se logre la expresión de la secuencia codificadora en condiciones compatibles con las secuencias control.

El término "secuencias reguladoras" incluye promotores y potenciadores y otras señales reguladoras de la expresión.

45 El término "promotor" se usa en el sentido normal de la técnica, p. ej., un sitio de unión de la ARN polimerasa.

La expresión aumentada de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención también se puede lograr mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, p. ej., regiones promotoras, líder de secreción y de terminación.

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

Se pueden usar incluso otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido de la presente invención.

5 Se conocen bien en la técnica ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en un huésped bacteriano, fúngico o de levadura.

El promotor puede adicionalmente incluir características para asegurar o aumentar la expresión en un huésped adecuado. Por ejemplo, las características pueden ser regiones conservadas como una Pribnow Box o una caja TATA.

Constructos

10 El término “constructo” – que es sinónimo de términos como “conjugado”, “casete” e “híbrido” – incluye una secuencia de nucleótidos para usar de acuerdo con la presente invención directa o indirectamente unida a un promotor.

15 Un ejemplo de una unión indirecta es la provisión de un grupo espaciador adecuado como una secuencia intrónica, como el intrón Sh1 o el intrón ADH, intermedio del promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo es cierto para el término “fusionado” en relación con la presente invención que incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no cubren la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína generalmente asociada con el promotor del gen del tipo salvaje y cuando ambos se encuentran en su entorno natural.

El constructo puede incluso contener o expresar un marcador que permite la selección del constructo genético.

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

20 Células huésped

El término “célula huésped” – en relación con la presente descripción incluye cualquier célula que comprende la secuencia de nucleótidos o un vector de expresión como se describió anteriormente y que se usa en la producción recombinante de una proteína que tiene las propiedades específicas como se definen en esta memoria.

Descrito en esta memoria, el organismo es un huésped de expresión.

25 Por lo tanto, se describen en esta memoria células transformadas o transfectadas huésped con una secuencia de nucleótidos que expresa la proteína de la presente invención. Las células se elegirán para que sean compatibles con dicho vector y, por ejemplo, pueden ser células procarióticas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas o de levadura.

Ejemplos de organismos huésped bacterianos adecuados son especies bacterianas gram positivas o gram negativas.

30 Descrito en esta memoria, las xilanasas enseñadas en esta memoria se expresan en el huésped de expresión *Trichoderma reesei*.

Descrito en esta memoria, el huésped de expresión para las xilanasas enseñadas en esta memoria pueden ser uno o más de los siguientes huéspedes de expresión fúngica: *Fusarium* spp. (como *Fusarium oxysporum*); *Aspergillus* spp. (como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans* o *A. awamori*) o *Trichoderma* spp. (como *T. reesei*).

35 Descrito en esta memoria, el huésped de expresión puede ser uno o más de los siguientes huéspedes de expresión bacteriana: *Streptomyces* spp. o *Bacillus* spp. (p. ej., *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*).

El uso de células huésped adecuadas – como células huésped de levadura y de hongos – pueden proporcionar modificaciones post-traduccionales (p. ej., miristoilación, glicosilación, truncamiento, lipidación y fosforilación en tirosina, serina o treonina) que pueden ser necesarias para conferir actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

40 Organismo

El término “organismo” en relación con la presente descripción incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la presente invención y/o productos obtenidos a partir de estos, y/o en donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención cuando está presente en el organismo.

45 Descrito en esta memoria, el organismo es un huésped de expresión.

Organismos adecuados pueden incluir un procariota, hongo, levadura o una planta.

El término “organismo transgénico” en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la presente invención y/o los productos

obtenidos de estos, y/o en donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención dentro del organismo. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos se incorpora en el genoma del organismo.

5 El término “organismo transgénico” no cubre secuencias de nucleótidos nativas en su entorno natural cuando están bajo el control de sus promotores nativos que también están en su entorno natural.

10 Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente descripción incluye un organismo que comprende cualquiera de, o combinaciones de, la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido de acuerdo con la presente invención, constructos de acuerdo con la presente descripción, vectores de acuerdo con la presente descripción, plásmidos de acuerdo con la presente descripción, células de acuerdo con la presente descripción, tejidos de acuerdo con la presente descripción o los productos de estos.

Por ejemplo, el organismo transgénico puede comprender también la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la presente invención bajo el control de un promotor heterólogo.

Transformación de la célula/organismo huésped

15 Como se indicó anteriormente, el organismo huésped puede ser un organismo procariótico o uno eucariótico. Ejemplos de huéspedes procarióticos adecuados incluyen *E. coli*, *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp., p. ej., *Bacillus subtilis*.

Están bien documentadas en la técnica las enseñanzas sobre la transformación de huéspedes procarióticos, por ejemplo, véase Sambrook et al., (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se usa un huésped procariótico entonces es posible que la secuencia de nucleótidos deba modificarse de manera adecuada antes de la transformación – como mediante eliminación de intrones.

20 Las células de hongos filamentosos se pueden transformar usando varios métodos conocidos en la técnica – como un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguido de la regeneración de la pared celular de una manera conocida. El uso de *Aspergillus* como un microorganismo huésped se describe en el documento EP 0 238 023.

Es generalmente bien conocida por los expertos en la técnica la transformación de procariotas, hongos y levaduras.

25 Un organismo huésped puede ser un hongo – como un moho. Ejemplos de tales huéspedes adecuados incluyen cualquier miembro que pertenezca a los géneros *Trichoderma* (p. ej., *T. reesei*), *Thermomyces*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora* y similares.

Descrito en esta memoria, el organismo huésped puede ser un hongo. Descrito en esta memoria, el organismo huésped pertenece al género *Trichoderma*, p. ej., *T. reesei*.

30 Cultivo y producción

Las células huésped transformadas con la secuencia de nucleótidos de la presente invención se pueden cultivar en condiciones que conducen a la producción del polipéptido codificado y que facilitan la recuperación del polipéptido a partir de las células y/o medio de cultivo.

35 El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para crecer la célula huésped en cuestión y obtener la expresión del polipéptido.

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

La proteína se puede secretar a partir de las células huésped y se puede recuperar convenientemente a partir del medio de cultivo usando procedimientos bien conocidos.

Secreción

40 A menudo, es deseable que la proteína sea secretada a partir de la expresión del huésped al medio de cultivo desde donde la proteína se puede recuperar más fácilmente. De acuerdo con la presente invención, la secuencia líder de secreción se puede seleccionar en base al huésped de expresión deseado. Las secuencias señal híbridas también se pueden usar con el contexto de la presente invención.

Aplicación a gran escala

45 En una realización preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se usa para aplicaciones a gran escala.

Preferiblemente la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 1 g por litro a aproximadamente 2 g por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo huésped.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 100 mg por litro a aproximadamente 900 mg por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo huésped.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 250 mg por litro a aproximadamente 500 mg por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo huésped.

5 Técnicas generales de metodología de ADN recombinante

La presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona con experiencia ordinaria en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Books 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al., (1995 y suplementos periódicos; *Current Protocols in Molecular Biology*, cap. 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press.

15 La invención se describirá ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonaje de la xilanas de *Fusarium verticillioides* (*FveXyn4*)

Se usó ADN genómico aislado de una cepa de *Fusarium verticillioides* para amplificar un gen de xilanas. La secuencia del gen clonado, llamado el gen *FveXyn4* se representa en la SEQ ID N°. 4. La proteína codificada por el gen *FveXyn4* se representa en la SEQ ID N°. 1. El producto proteico del gen *FveXyn4* pertenece a la familia de las glicosil hidrolasas 10 (GH10) en base a la búsqueda de PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). En el extremo N-terminal, la proteína *FveXyn4* tiene un péptido señal de 15 aminoácidos predicho por SignalP-NN (Emanuelsson et al., *Nature Protocols*, 2: 953-971, 2007). Esto indica que *FveXyn4* es una glicosil hidrolasa secretada.

25 Ejemplo 2

Expresión de la proteína *FveXyn4*

Se amplificó el gen *FveXyn4* de ADN genómico de *Fusarium verticillioides* usando los siguientes cebadores: Cebador 1 5'-caccATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTA-3' (SEQ ID N°. 7) y Cebador 2 5'-TTTTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAGC-3' (SEQ ID N°. 8). Se clonó el producto de PCR en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen K2400) para generar el plásmido pEntry *FveXyn4*. El plásmido de expresión pZZH254 se obtuvo mediante la reacción de clonación Gateway entre el plásmido pEntry *FveXyn4* y el vector de expresión pTrex3gM (descrito en el documento de EE.UU. 2011/0136197 A1) usando el kit enzimático Gateway® LR Clonase® (Invitrogen 11791). Se proporciona un mapa del plásmido pZZH254 como se muestra en la Figura 10. La secuencia del gen *FveXyn4* se confirmó mediante secuenciación de ADN (SEQ ID N°. 4). El plásmido pZZH254 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* eliminada cuádruple (descrita en el documento WO 05/001036) usando un método biolístico (Te'o VS et al., *J. Microbiol. Methods*, 51: 393-9, 2002).

Tras la confirmación de la secuencia, se transformaron protoplastos de una cepa de *T. reesei* eliminada cuádruple (descrita en el documento WO 05/001036) con el plásmido de expresión pTTT-Ate CA1 usando el método de protoplasto PEG (Penttila et al., *Gene*, 61: 155-164, 1987). Para la preparación de protoplastos, se crecieron esporas durante aproximadamente 10 horas a 24°C en Medio Mínimo MM de *Trichoderma* (glucosa 20 g/l, KH₂PO₄ 15 g/l, pH 4,5, (NH₄)₂SO₄ 5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,6 g/l, CaCl₂·2H₂O 0,6 g/l, 1 ml de solución de elementos traza de *T. reesei* 1000X (Ácido Cítrico anhidro 175 g/l, FeSO₄·7H₂O 200 g/l, ZnSO₄·7H₂O 16 g/l, CuSO₂ 3,2 g/l, MnSO₄·H₂O 1,4 g/l y Ácido Bórico 0,8 g/l). Se recogieron las esporas en germinación por centrifugación y se trataron con solución Vinoflow FCE (Novozymes, AG Suiza) a 30 mg/ml durante 7 horas hasta toda la noche a 30°C a 100 rpm para lisar las pareces celulares fúngicas. Los protoplastos se lavaron en tampón Tris HCl 0,1 M (pH 7) que contenía sorbitol 0,6 M y se resuspendieron en tampón Tris HCl 10 mM (pH 7,5) que contenía sorbitol 1,2 M y cloruro cálcico 10 mM. Para la transformación PEG, se trataron 1 µg de ADN y 1-5 x10⁷ protoplastos en un volumen total de 200 µl con 2 ml de solución PEG al 25%, se diluyeron con 2 volúmenes de solución de sorbitol 1,2 M/Tris 10 mM, pH 7,5/CaCl₂ 10 mM. Se seleccionaron transformantes en un medio que contenía acetamida como única fuente de nitrógeno (acetamida 0,6 g/l; cloruro de cesio 1,68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrógeno fosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidrato 0,6 g/l; cloruro cálcico dihidrato 0,6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de zinc 1,4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1,6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4,25). Las colonias transformadas (aproximadamente 50-100) aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento en placas de acetamida, se recogieron las esporas y se volvieron a seleccionar en placas de acetamida. Después de 5 días, se recogieron las esporas usando glicerol al 10% y se inocularon 1 x 10⁸ esporas en un matraz de agitación de 250 ml con 30 ml de medio definido de Glucosa/Soforosa para la expresión de proteínas. La expresión de proteínas se confirmó mediante SDS-PAGE. La

suspensión de esporas se cultivó posteriormente en un fermentador de 7 l en un medio definido que contenía alimento de glucosa/soforosa al 60%. El medio definido de Glucosa/Soforosa (por litro) consiste en 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 33 g de tampón PIPPS, 9 g de Casaminoácidos, 4,5 g de KH_2PO_4 , 1 g de CaCl_2 anhidro, 1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH hasta 5,5 ajustado con NaOH al 50% con H_2O Mili-Q hasta llevarlo a 966,5 ml. Después de la esterilización, se añadieron los siguientes: 26 ml de Glucosa/Soforosa al 60% y 2,5 ml de *T. reesei*/Metales Traza 400X.

FveXyn4 se purificó a partir de caldo de fermentación concentrado de un cultivo de fermentador de 7 l usando dos columnas de cromatografía. El caldo de fermentación concentrado tamponado en tampón fosfato sódico 20 mM pH 6,0 que contenía sulfato amónico 1 M se cargó en una columna de cromatografía de interacción hidrofóbica (Phenil Sepharosa FF, 26/10). La proteína se eluyó de la columna usando un gradiente lineal de tampón de equilibrado/lavado a tampón fosfato sódico 20 mM pH 6,0. La fracción que contenía la proteína FveXyn4 se cargó en una columna de filtración en gel (HiLoad Superdex 75 pg 26/60) y la fase móvil usada fue fosfato sódico 20 mM, pH 7,0 que contenía NaCl 0,15 M. La proteína purificada se concentró usando un dispositivo Amicon Ultra-15 3K y la fracción de proteína concentrada se usó en estudios adicionales.

La secuencia de nucleótidos del gen *FveXyn4* del plásmido de expresión pZZH254 se presenta como la SEQ ID N°. 4. La secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas) y el intrón predicho se muestra en negrita y en minúscula.

La secuencia de aminoácidos de la proteína expresada FveXyn4 del plásmido pZZH254 se presenta como la SEQ ID N° 1. La secuencia señal predicha por el programa SignalP-NN se muestra subrayada. Esta es la pre-pro-proteína.

La secuencia de aminoácidos de la forma madura predicha de la proteína FveXyn4 se presenta como la SEQ ID N°. 3. Esta es la forma activa de la enzima. La SEQ ID N°. 2 muestra la pro-proteína, es decir, antes de la modificación post-traducciona. Dependiendo del huésped, la modificación post-traducciona puede variar y, por lo tanto, la presente invención también abarca formas maduras y activas de la SEQ ID N°. 2.

Ejemplo 3

Actividad xilanasa de FveXyn4

FveXyn4 pertenece a la familia de glicosil hidrolasa 10 (GH10, número de CAZy). La actividad beta 1-4 xilanasa de FveXyn4 se midió usando xilano al 1% de madera de abedul (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1% de harina de trigo (megazyme P-WAXYM) como sustratos. El ensayo se realizó en tampón citrato sódico 50 mM pH 5,3, Tween-80 al 0,005% a 50°C durante 10 minutos.

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

Ejemplo 4

Perfil de pH de FveXyn4

El perfil de pH de FveXyn4 se determinó usando xilano de madera de abedul (Sigma 95588) como sustrato. El ensayo se realizó en solución tampón Citrato Sódico/Fosfato Sódico ajustada a valores de pH entre 2 y 9. El xilano de abedul (solución al 2%) disuelto en agua se mezcló con el mismo volumen de solución tampón de Citrato/Fosfato 50 mM en una placa de 96 pocillos y se equilibró el sustrato a 50°C antes de añadir la enzima. Después de 10 minutos, se paró la reacción enzimática transfiriendo 60 microlitros de mezcla de reacción a una placa de PCR de 96 pocillos que contenían 100 microlitros de solución de DNS. Se calentó la placa de PCR a 95°C durante 5 minutos en un motor de ADN Bio-Rad. Luego se enfrió la placa a temperatura ambiente y se transfirieron 100 microlitros de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos. La liberación de azúcares reductores del sustrato se cuantificó midiendo la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro. La actividad enzimática a cada pH se refirió como actividad relativa donde la actividad al pH óptimo se estableció en el 100%. El perfil de pH de FveXyn4 se muestra en la Figura 11. Se encontró que FveXyn4 tenía un pH óptimo a aproximadamente 6 y se encontró que retenía más del 70% de la actividad máxima entre pH 4,6 y 7.

Ejemplo 5

Perfil de temperatura de FveXyn4

La temperatura óptima de FveXyn4 purificado se determinó ensayando la actividad xilanasa a temperaturas que varían entre 40°C y 75°C durante 10 minutos en tampón citrato sódico 50 mM a pH 5,3. Se refirió la actividad como actividad relativa donde la actividad a la temperatura óptima se estableció en el 100%. El perfil de temperatura de FveXyn4 se muestra en la Figura 12. Se encontró que FveXyn4 tenía una temperatura óptima a 60°C y se encontró que retenía más del 70% de la actividad máxima entre 45°C y 64°C.

Ejemplo 6

Solubilización de pentosano (ruptura o solubilización de arabinosilano insoluble (AXinsol))

La nueva xilanasa (FveXyn4) se clonó, expresó, purificó y caracterizó y se probó frente a un producto de xilanasa de referencia (Econase®XT).

- 5 Se usó la capacidad para solubilizar arabinosilano soluble a partir de 4 sustratos, a saber, trigo, salvado de trigo, maíz y DDGS de maíz como criterios clave de selección.

10 La nueva xilanasa mostró un alto rendimiento en la solubilización de pentosano a partir de materias primas de alimentos relevantes (trigo, salvado de trigo, maíz, DDGS de maíz). Sorprendentemente, la nueva xilanasa era mucho mejor que los productos de referencia (p. ej., los productos de xilanasa comercialmente disponibles) sobre un gran número de sustratos.

En particular, la enzima fue sorprendentemente muy superior a la de referencia en los materiales a base de maíz.

La nueva xilanasa también muestra numerosas propiedades ventajosas para su uso industrial incluyendo inesperadamente alta solubilización de pentosano, particularmente en piensos que comprenden maíz.

6.1. Materiales y métodos

15 Muestras de enzima

Las xilanasas usadas en este estudio son:

20 Una nueva xilanasa GH10 de *Fusarium verticilloides* (designada FveXyn4) expresada en *Trichoderma reesei*, en donde la xilanasa se usó en forma purificada – esta enzima se puede denominar en esta memoria como FveXyn4, y la xilanasa de referencia comercialmente disponible: Econase®XT. Esta enzima de referencia Econase®XT se extrajo de muestras formuladas secas comerciales. El componente de xilanasa de las muestras formuladas secas comerciales de Econase®XT se extrajo en una suspensión (p/p) al 33% usando tampón Mcllvain, pH 5,0. El extracto se aclaró por centrifugación (RCF 3000 durante 10 min.) y se filtró usando un filtro de jeringa PALL Acrodisc PF (membrana Supor 0,8/0,2 µm) y se calentó posteriormente 20 min. a 70°C. Después de eliminar la precipitación por centrifugación (RCF 38 724 durante 15 min.) se reemplazó el tampón pasando a través de una columna Sephadex G25 (PD10 de Pharmacia) equilibrada con Citrato Na 20 mM, NaCl 20 mM, pH 3,4. La purificación del componente de xilanasa se realizó usando resina Source 15S, seguido de elución con un gradiente lineal de sal progresivo (NaCl en tampón Citrato Na 20 mM, pH 3,4).

25 La Econase XT® es una endo-1,4-β-xilanasa (EC 3.2.1.8) producida por la cepa *Trichoderma reesei* RF5427 (CBS 114044) disponible en ABVista.

30 La concentración de proteína se determinó midiendo la absorción a 280 nm. Los coeficientes de extinción se estimaron a partir de las secuencias de aminoácidos. Para la Econasa XT, se calculó que la absorción a 280 nm de 1 mg/ml era de 2,84 AU.

Materias primas de alimentación

35 El alimento usado en estos experimentos es materia prima. Los alimentos son maíz, DDGS de maíz, trigo o salvado de trigo.

Solubilización de pentosano (solubilización de AXinsol)

40 El método usado para la solubilización de pentosano fue: se transfirieron 100 mg de materia prima de alimentación a un tubo Eppendorf de centrífuga de 2 ml y se registró el peso exacto. Se añadieron 750 µl de tampón de incubación (HEPES 200 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,0) y 900 ml de solución de cloranfenicol (40 µg/ml de tampón de incubación). Se añadió la enzima de elección para obtener un volumen total de 1,8 ml.

45 Cada muestra se ensayó en dobletes y en paralelo con un blanco (incubación sin enzima exógena añadida). Las muestras se incubaron en un termomezclador de Eppendorf a 40°C con agitación. Después de 2 o 18 horas de incubación, se filtró el sobrenadante usando placas de filtración de 96 pocillos (Pall Corporation, AcroPrep 96 Filter Plate, Glass 1,0 µm, NTRL, 1 ml por pocillo). Después de la filtración, las muestras se almacenaron a 4°C hasta análisis de la cantidad total de azúcares C5, arabinosa y xilosa.

Cuantificación de azúcares C5 (pentosanos)

50 Se midió la cantidad total de pentosas llevadas en solución usando el método de Rouau y Surget (1994, A rapid semi-automated method of the determination of total and water-extractable pentosan in wheat flours. Carbohydrate polymers, 24, 123-32) con un aparato de inyección de flujo continuo (Figura 7). Los sobrenadantes se trataron con ácido para hidrolizar polisacáridos a monoazúcares. Se añadió floroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno) para la reacción con

monopentosas y monohexosas, que forma un complejo coloreado. Midiendo la diferencia en absorbancia a 550 nm en comparación con 510 nm, se calculó la cantidad de pentosas en la solución usando una curva estándar. A diferencia del complejo pentosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo hexosa-floroglucinol es constante a estas longitudes de onda. Se añadió glucosa a la solución de floroglucinol para crear una señal de glucosa constante y además asegurar que no haya interferencia de los azúcares de hexosa.

6.2. Resultados y discusión

La solubilización de pentosano se monitorizó en una configuración de respuesta a la dosis usando subproductos fibrosos de trigo (concretamente salvado de trigo) y un subproducto fibroso de maíz (concretamente cDDGS).

Los resultados de la Econase® XT de referencia y de la nueva xilanasa (FveXyn4) se muestran en la Figura 8 (en salvado de trigo) y la Figura 9 (en DDGS de maíz).

La Figura 8 muestra la liberación de pentosano (azúcar C-5) (solubilización de pentosanos) de salvado de trigo como una función de la dosis de xilanasa. Las xilanasas usadas fueron la xilanasa de la presente invención (FveXyn4) en comparación con la xilanasa de referencia, concretamente Econase® XT.

La Figura 9 muestra la solubilización de pentosanos de cDDGS como una función de la dosis de xilanasa. Las xilanasas usadas fueron la xilanasa de la presente invención (FveXyn4) en comparación con la xilanasa de referencia, concretamente Econase® XT.

La Econase® XT actúa bien sobre el trigo, pero muestra un efecto nulo o limitado en el maíz.

Esto indica una clara diferencia en la especificidad de sustrato en comparación, por ejemplo, con FveXyn4, sorprendentemente FveXyn4 es buena rompiendo AXinsol (p. ej., solubilizando pentosanos) tanto en sustratos de trigo como de maíz. Típicamente, las enzimas xilanasa son malos actores en productos a base de maíz. Sorprendentemente, la presente enzima es capaz de disolver arabinoxilanos insolubles (AXinsol) tanto en sustratos a base de trigo como de maíz.

Vale la pena señalar que la xilanasa comercialmente disponible probada (Econase® XT) no mostró una solubilización del maíz significativa. De hecho, hay muy pocas xilanasas comercialmente disponibles que muestran una capacidad significativa para disolver AXinsol en el maíz (o solubilización del maíz). Aquí es donde la presente enzima difiere significativamente.

Ejemplo 7

Reducción de la viscosidad en el ensayo de modelo animal *in vitro*

La reducción de la viscosidad en el trigo se determinó usando una versión modificada del procedimiento descrito por Bedford & Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). Se mezclaron 3,6 ml de solución de pepsina (2000 U/ml en HCl 0,1 N) con 2,4 g de trigo antes de la adición de la cantidad indicada de xilanasa (FveXyn4) seguido de 45 min de incubación a 40°C. Luego se mezclaron 1,2 ml de solución de pancreatina (8 mg/ml en MES 1 M, pH 6,8) en la suspensión lo que da como resultado un pH final de 6,0. La muestra se dejó incubar durante 60 min a 40°C con mezcla después de 30 y 60 min. La muestra se colocó después en hielo durante 5 min para parar la reacción y se centrifugó 10 min a 3320 RCF seguido de filtración a través de un filtro de 0,45 mm para obtener un sobrenadante claro. Después se midió la viscosidad de la muestra a 20°C usando un viscosímetro digital Brookfield (modelo DV-I+, Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA 02172, EE.UU.) ajustado con un cono CPE-40 y placa. Cada punto de datos es el promedio de tres repeticiones.

Los resultados se muestran en la Figura 13. Como se puede ver, incluso en estas condiciones (condiciones que intentan imitar el entorno en el intestino delgado de un animal), FveXyn4 reduce la viscosidad.

Ejemplo 8

Reducción de la viscosidad en el material a base de grano (p. ej., para la producción de biocombustible)

En la industria europea del alcohol combustible, los granos pequeños como el trigo, la cebada y el centeno son materias primas comunes, en contraste con los EE.UU. donde se usa principalmente maíz. Estos pequeños granos contienen, junto con el almidón, altos niveles de polímeros polisacáridos que no son almidón (NSP), como celulosa, beta-glucano y hemicelulosa.

La proporción en la que están representados los diferentes NSPs difieren para cada materia prima.

Los NSPs dan una alta viscosidad a las papillas de grano debido a su gran capacidad de retención de agua. La alta viscosidad tiene un impacto negativo en la producción de etanol ya que limitará la concentración de sólidos que se puede usar en el macerado y reducirá la eficiencia energética del proceso. Además, las hemicelulosas residuales presentes a lo largo del proceso pueden contribuir al ensuciamiento de los intercambiadores de calor y en el equipamiento de destilación. El mayor impacto de una alta viscosidad se observa cuando una papilla se enfría a la

temperatura de fermentación (32°C). Esto explica que la viscosidad debe reducirse en el proceso en cualquier lugar antes del paso de enfriamiento.

8.1. Materiales y métodos

5 Se usó un Analizador Rápido Visco (RVA 4500) de Perten Instruments para medir los perfiles de viscosidad de una papilla de trigo. El RVA 4500 es un viscosímetro de agitación para calentar con temperatura en rampa y cizallamiento variable que se puede usar para determinar la calidad y las características de procesamiento del almidón en granos, tubérculos, harinas y alimentos y alimentación extruidos y cocidos. También hay aplicaciones para alimentos proteicos, ingredientes como almidones modificados e hidrocoloides y malteado y elaboración de cerveza.

10 La papilla de trigo (50 gramos de un 30% de DS, 34,86% “como está” en suspensión) se preparó de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Pesar 17,42 gramos de trigo
- En un vaso de precipitados de 50 ml, pesar 32,58 gramos de agua del grifo y agregar 114 µl de H₂SO₄ 4 N.
- Añadir el trigo al agua y agitar durante 5 minutos a velocidad máxima (aprox. 500 rpm) con un agitador superior
- 15 - Transferir 25,0 gramos de esta suspensión (pH 5,2) a una copa RVA, añadir enzimas diluidas 50 veces y comenzar la RVA
- Dividir toda la suspensión en dos tubos de centrifuga Greiner de 15 ml y centrifugar 10 minutos a 3500 rpm (2547 g)
- Determinar la separación de capas (leer la escala de volumen en el tubo de centrifuga)

20 El término “contenido de sólidos secos (DS)” se refiere a los sólidos totales (disueltos y no disueltos) de una suspensión (en %) en base al peso seco. Al inicio, la “DS inicial” se refiere a los sólidos secos en la suspensión en el momento cero. A medida que avanza la reacción de hidrólisis, la porción de DS que se disuelve se puede denominar “DS jarabe” así como “DS sobrenadante”.

25 En cada experimento (25 gramos de suspensión), se administraron las xilanasas FveXyn4 y FoxXyn2 a 25 µg de proteína (por 8,71 g de trigo “como está”), que corresponde a 2,9 µg de proteína por g de trigo “como está”. XYLATHIN™ se dosificó a 4 µg de proteína por g de trigo “como está”. SPEZYME® CL se dosificó a 2 AAU/g de DS (2,3 AAU/g “como está”).

30 Se imitó una licuefacción de trigo estándar en el RVA. Se realizó un tratamiento previo durante 20 minutos a 60°C seguido de una etapa de licuefacción durante 30 minutos a 85°C. Después del tratamiento previo y la licuefacción, se enfrió la suspensión a 32°C, para determinar la viscosidad en las condiciones de fermentación. Las Tablas a continuación contienen las viscosidades después de cada etapa, los perfiles completos de RVA se muestran en la Figura 14 y 18.

35 En un experimento, se comparó el rendimiento de FveXyn4, *Fusarium verticilloides*, con Xylathin™ de Verenium (de referencia). La enzima en Xylathin™ es una glicosil hidrolasa de la familia 11 de una bacteria no cultivada (metagenómica) (patente de EE.UU. 7504120).

Tabla 8.1

	Viscosidad (mPa*s)		
	Blanco	Xylathin™, de referencia	FveXyn4
Después del pretratamiento (tiempo de procesamiento 1200 seg.)	626	361	183
Después de la licuefacción (tiempo de procesamiento 3120 seg.)	495	177	106
A la temperatura de fermentación (tiempo de procesamiento 3660 seg.)	1005	379	222
Brix después de ejecutar RVA	27,50 ± 0,27	27,89	28,18

El valor Brix es una medida de la concentración de la sustancia disuelta, por ejemplo azúcares, en un líquido acuoso o jarabe en el caso de procesamiento de grano. Se usa para cuantificar el proceso de solubilización/degradación de los azúcares. Cuanto más altos son los valores, más azúcares se disuelven. Los valores de referencia son necesarios para la comparación. Los valores de Brix se expresan en grados y se miden usando un refractómetro.

Estos datos junto con la Figura 14 muestran que FveXyn4 supera a Xylathin™ en la viscosidad.

En otro experimento, el rendimiento de FoxXyn2, *Fusarium oxysporum* se comparó con Xylathin™ de Verenium (de referencia). La enzima en Xylathin™ es una glicosil hidrolasa de la familia 11 de bacteria no cultivada (metagenómica) (patente de EE.UU. 7504120).

5

Tabla 8.2

	Viscosidad (mPa*s)		
	Blanco	Xylathin™, de referencia	FoxXyn2
Después del pretratamiento (tiempo de procesamiento 1200 seg.)	626	361	204
Después de la licuefacción (tiempo de procesamiento 3120 seg.)	495	177	115
A la temperatura de fermentación (tiempo de procesamiento 3660 seg.)	1005	379	237
Brix después de ejecutar RVA	27,50 ± 0,27	27,89	30,20

Estos datos junto con la Figura 18 muestran que FoxXyn2 supera a Xylathin™ en la viscosidad.

Ejemplo 9

Separación de gluten-almidón de trigo

10 La separación de la harina de trigo en fracciones de almidón y gluten se aplica industrialmente a gran escala para obtener almidón A de alta calidad y subproductos de almidón B y gluten vital.

La separación se mejora por la adición de xilanasas.

9.1. Materiales y métodos

15 El siguiente ensayo simula la separación de almidón de trigo de un proceso de batido a 40°C. En este ensayo, la harina de trigo industrial (Cargill) se añadió a agua del grifo precalentada (50°C) para crear una suspensión de DS al 35% mezclando 1 minuto en una batidora de cocina (Braun). El pH de la suspensión se mantuvo "como está" en ~6,1. Se transfirieron 100 gramos de esta suspensión al viscosímetro Haake VT550, que se calibró a 40°C. Después de 1 minuto de incubación, se añadió la solución de enzima a la suspensión. Mientras tanto, se controló el perfil de viscosidad antes y después de la adición de enzima durante 15 minutos en total. Después de la incubación, se tomaron muestras por triplicado de la suspensión incubada de una muestra de suspensión t_0 para una prueba de centrifugado.

20 Cada muestra de prueba de centrifugado tiene un peso total de 22,5 g que contienen 15,8-15,9 g de muestra de suspensión añadida a 6,6-6,7 g de tubo de centrifuga desechable (15 ml). Todas las muestras se centrifugaron en una centrífuga Hermle Z400 durante 15 minutos a 3500 rpm. Los valores de Brix se determinaron a partir del jarabe de las muestras centrifugadas.

Ejemplo 9A

25 En un experimento, el rendimiento de la xilanasas FevXyn4 de acuerdo con la presente invención en un proceso de separación de gluten-almidón de trigo se comparó con las enzimas comerciales, Shearzyme Plus™ (Novozymes). La enzima comercial Shearzyme Plus™ se dosificó a 0,20 kg/MT DS. La xilanasas FevXyn4 se probó a una dosis de 1,19 g de proteína/MT DS.

30 Se preparó un batido de 35% de sólidos secos (pH "como está" a ~6,1) añadiendo harina de trigo Cargill a agua desmineralizada precalentada a 50°C, mientras se mezcla de manera continua en una batidora Braun durante 1 minuto a 18900 r.p.m. De este batido, se transfirieron 100 g al viscosímetro Haake VT550, se precalentó a 40°C y se agitó a $\gamma = 50$ 1/s. La viscosidad se midió durante 1 minuto, después de lo cual se añadieron las enzimas y la viscosidad se monitorizó durante un total de 15 minutos, véanse los resultados en la Tabla 1. Los valores subrayados son valores de viscosidad más bajos o, en otras palabras, mejores en rendimiento que los de referencia, Shearzyme Plus™. Está claro que la xilanasas FevXyn4 tiene un rendimiento significativamente mejor que el de Shearzyme Plus™ de referencia.

35

En sucesión, se pusieron tres muestras del batido inmediatamente después de la incubación en tubos de centrifuga desechables de 15 ml, cada uno con un peso total de 22,5 g. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm en una centrífuga Hermle Z400 y se midieron y promediaron las capas individuales para los triplicados. La Tabla 2 muestra el porcentaje de cada capa para el blanco, un batido sin adición de enzima incubada en el viscosímetro Haake VT550 en las mismas condiciones y para todas las xilanasas analizadas. Los valores subrayados de la capa de sobrenadante (%) son considerablemente mayores que los de referencia, Shearzyme Plus™.

40

Tabla 9.1: El efecto de las xilanasas sobre la viscosidad de la harina en el tiempo, durante una incubación de 15 minutos a 40°C.

Tiempo (min)	Viscosidad en el tiempo (mPA*s)		
	Blanco	Shearzyme Plus™ (Referencia)	FveXyn4
0	481,13	513,00	494,1
5	393,50	295,90	<u>204,1</u>
10	375,83	238,70	<u>155,5</u>
15	354,97	210,60	<u>130,7</u>
Brix a t ₁₅	5,88	6,07	<u>6,32</u>

Tabla 9.2: El efecto de las xilanasas en la separación de almidón de trigo después de 15 minutos de incubación a 40°C.

Promedio de capas separadas (%)	Blanco	Shearzyme Plus™ (Referencia)	FveXyn4
Almidón	33,74	34,6	34,3
Fibra	16,84	14,0	13,2
Sedimento	24,22	23,3	20,2
Sobrenadante	25,20	28,1	<u>32,3</u>

5 Ejemplo 9B

En un segundo experimento, el rendimiento de la xilanasas FoxXyn2 en un proceso de separación de almidón de trigo se comparó con la enzima comercial, Shearzyme Plus™. La enzima comercial Shearzyme Plus™ se dosificó a 0,20 kg/MT DS. La xilanasas FoxXyn2 se probó a una dosis de 1,19 g de proteína /MT DS.

10 Se preparó un batido de sólidos secos al 35% (pH “como está” a ~6,1) añadiendo harina de trigo Cargill a agua desmineralizada precalentada a 50°C mientras se mezcla continuamente en una batidora Braun durante 1 minuto a 18900 r.p.m. A partir de este batido, se transfirieron 100 g al viscosímetro Haake VT550, se precalentó a 40°C y se agitó a $\gamma = 50$ 1/s. Se midió la viscosidad durante 1 minuto después de lo cual se agregaron las enzimas y se monitorizó la viscosidad durante un total de 15 minutos, véanse los resultados en la Tabla 1. Los valores subrayados son valores de viscosidad más bajos o, en otras palabras, mejores resultados que los de la Shearzyme Plus™ de referencia. Está claro que la xilanasas FoxXyn2 tiene un rendimiento significativamente mejor que la Shearzyme Plus™ de referencia.

15 En sucesión, se pusieron tres muestras del batido inmediatamente después de la incubación en tubos de centrifuga desechables de 15 ml, cada uno con un peso total de 22,5 g. Los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 r.p.m. en una centrifuga Hermle Z400 y se midieron y promediaron las capas individuales para los triplicados. La Tabla 2 muestra el porcentaje de cada capa para el blanco, un batido sin adición de enzima incubada en el viscosímetro Haake VT550 en las mismas condiciones y para todas las xilanasas analizadas. Los valores subrayados de la capa de sobrenadante (%) son considerablemente mayores que los de referencia, Shearzyme Plus™.

Tabla 9.3: El efecto de las xilanasas sobre la viscosidad de harina de trigo en el tiempo, durante una incubación de 15 minutos a 40°C.

Tiempo (min)	Viscosidad en el tiempo (mPA*s)		
	Blanco	Shearzyme Plus™ (Referencia)	FoxXyn2
0	481,13	513,00	488,4
5	393,50	295,90	<u>203,05</u>
10	375,83	238,70	<u>152,25</u>
15	354,97	210,60	<u>126,35</u>
Brix a t ₁₅	5,88	6,07	<u>6,35</u>

Tabla 9.4: El efecto de las xilanasas en la separación de almidón de trigo después de 15 minutos de incubación a 40°C.

Promedio de capas separadas (%)	Blanco	Shearzyme Plus™ (Referencia)	FoxXyn2
Almidón	33,74	34,6	34,1
Fibra	16,84	14,0	13,5
Sedimento	24,22	23,3	19,9
Sobrenadante	25,20	28,1	<u>32,5</u>

Ejemplo 10

Clonaje de la xilanasas *FoxXyn2* de *Fusarium oxysporum*

- 5 La secuencia de nucleótidos del gen *FoxXyn2* aislado de *Fusarium oxysporum* se establece como SEQ ID Nos. 12, 13 y 14. El intrón predicho se muestra en la SEQ ID N°. 12 (Figura 19) en cursiva y en minúsculas.

La secuencia de aminoácidos del precursor de la proteína *FoxXyn2* se establece como SEQ ID N°. 9 (Figura 15). La secuencia señal predicha se muestra en cursiva y en minúsculas.

- 10 La secuencia de aminoácidos de las formas maduras predichas de *FoxXyn2* se establece como las SEC ID Nos. 10 y 11 (mostradas en las Figuras 15 y 17). La SEQ ID N°. 10 muestra una sección del polipéptido que se puede escindir antes de la maduración completa de la proteína. La forma activa de la proteína puede ser con o sin esta sección y, por lo tanto, la proteína activa puede tener la SEQ ID N°. 10 o la SEQ ID N°. 11.

El producto proteico del gen *FoxXyn2* pertenece a la familia de glicosil hidrolasa 10. Esto sugiere que *FoxXyn2* es una glicosil hidrolasa secretada.

15 Ejemplo 11

Expresión de la proteína *FoxXyn2*

- 20 Se amplificó el gen *FoxXyn2* a partir de ADN genómico de *Fusarium oxysporum* usando los siguientes cebadores: Cebador 1 5'-ccgcgccgcaccATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACC-3' (SEQ ID N°. 19) y el Cebador 2 5'-ccgcgccgccttaTTAGCGAGAGCGTTGACAACAG-3' (SEQ ID N°. 20). Después de digerir con *Not I* y *Asc I*, se clonó el producto de PCR en el vector de expresión pTrex3gM (descrito en el documento US 2011/0136197 A1) digerido con las mismas enzimas de restricción y el plásmido resultante se marcó como pZZH135. Se proporciona un mapa plasmídico de pZZH135 en la Figura 22. La secuencia del gen *FoxXyn2* se confirmó mediante secuenciación de ADN.

- 25 El plásmido pZZH135 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* eliminada cuádruple (descrita en el documento WO 05/001036) usando un método biolístico (enseñado en Te'o VS et al., J. Microbiol. Methods, 51: 393-9, 2002). La proteína aislada a partir del sobrenadante de cultivo después de la filtración se usó para realizar el análisis de SDS-PAGE y el ensayo de actividad de xilanasas para confirmar la expresión de la enzima.

La secuencia de nucleótidos del gen *FoxXyn2* del plásmido de expresión pZZH135 se establece como SEQ ID N°. 12 (Figura 19). La secuencia señal se muestra en negrita y el intrón predicho se muestra en cursiva y en minúsculas.

- 30 La secuencia de aminoácidos de la proteína expresada *FoxXyn2* del plásmido pZZH135 se establece como SEQ ID N°. 9 (Figura 15). La secuencia señal se muestra en cursiva.

La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína *FoxXyn2* se establece como SEQ ID N°. 10 (Figura 16).

FoxXyn2 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo usando cromatografía de afinidad de resina Blue Sepharosa, 6FF, y se usaron muestras par la caracterización bioquímica como se describe en los ejemplos posteriores.

35 Ejemplo 12

Actividad xilanasas de *FoxXyn2*

- 40 *FoxXyn2* pertenece a la familia de glicosil hidrolasa 10 (GH10, número CAZy). La actividad beta 1-4 xilanasas de *FoxXyn2* se midió usando xilano al 1% de madera de abedul (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1% de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM) como sustratos. El ensayo se realizó en tampón citrato sódico 50 mM pH 5,3, Tween-80 al 0,005% a 50°C durante 10 minutos.

El azúcar reductor liberado se cuantificó mediante la reacción con ácido 3, 5-dinitrosalicílico y medida de la absorbancia a 540 nm. Se cuantifica la actividad enzimática en relación con una curva estándar de xilosa. En este ensayo, se define

una unidad de xilanas (U) como la cantidad de enzima requerida para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo.

Ejemplo 13

Perfil de pH de FoxXyn2

5 El perfil de pH de FoxXyn2 se determinó usando xilano de madera de abedul (Sigma 95588) como sustrato. El ensayo se realizó en solución tampón de Citrato Sódico/Fosfato Sódico ajustado a valores de pH entre 2 y 9. Se mezcló xilano de madera de abedul (solución al 2%) disuelto en agua con un volumen igual de solución tampón Citrato Sódico/Fosfato Sódico 50 mM en una placa de 96 pocillos y se equilibró el sustrato a 50°C antes de añadir la enzima. Después de 10 minutos, se paró la reacción enzimática transfiriendo 60 microlitros de mezcla de reacción a una placa de 96 pocillos que contenía 100 microlitros de solución de DNS. La placa de PCR se calentó a 95°C durante 5 minutos en un Motor de ADN Bio-Rad. Luego se enfrió la placa a temperatura ambiente y se transfirieron 100 microlitros de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos. Se cuantificó la liberación de azúcares reductores a partir del sustrato midiendo la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro. Se informó la actividad enzimática a cada pH como actividad relativa donde la actividad en el pH óptimo se estableció en 100%. El perfil de pH de FoxXyn2 se muestra en la Figura 23. Se encontró que FoxXyn2 tiene un pH óptimo a aproximadamente 6 y se encontró que retenía más del 50% de la actividad máxima entre pH 4,5 y 6,5.

Ejemplo 14

Perfil de temperatura de FoxXyn2

20 La temperatura óptima de FoxXyn2 purificada se determinó ensayando la actividad xilanas a temperaturas que varían entre 45°C y 94°C durante 10 minutos en tampón citrato sódico 50 mM a pH 5,3. La actividad se informó como actividad relativa donde la actividad a la temperatura óptima se estableció en 100%. El perfil de temperatura de FoxXyn2 se muestra en la Figura 24. Se encontró que FoxXyn2 tenía una temperatura óptima de 60°C y se encontró que retenía más del 50% de la actividad máxima entre 40°C y 65°C.

Ejemplo 15

25 FveXyn4 en alimentos para animales – Cerdos

15.1. Materiales y métodos

30 Se llevan a cabo dos experimentos para evaluar la eficacia de FveXyn4 en dietas a base de maíz/DDGS de maíz (Experimento 1) y en dietas a base de trigo/salvado de trigo (Experimento 2). Un Comité de Cuidado y Uso de Animales aprueba el uso de los cerdos y se usan las pautas de bienestar pertinentes para el país. Cada experimento usó un total de 48 cerdos ([♀ Yorkshire x Landrace] x ♂ Duroc) alojados en grupos de dos y cada redil contenía un cerda joven y un cerdo castrado. Cada redil tiene dos lados de plástico transparente lisos y suelos de chapa metálica cubierta de plástico en una habitación con temperatura controlada (22 ± 2°C).

Tabla 15.1: Dietas basales

Item	Experimento 1	Experimento 2
Maíz	41,44	
DDGS de maíz de EE.UU.	40,0	
Trigo duro		56,57
Salvado de trigo		5,06
Triturados de trigo		19,94
Harina de soja	15,00	13,50
Sebo		0,99
L-Lisina HCl	0,75	0,73
DL-Metionina	0,10	0,17
L-Treonina	0,25	0,30
L-Triptófano	0,06	0,01
Marcador de digestibilidad (celite)	0,30	0,30
Sal	0,30	0,47

Item	Experimento 1	Experimento 2
Caliza	1,30	1,38
Fosfato Monocálcico	0,00	0,08
Premezcla de vitaminas/minerales traza ¹	0,50	0,50
Provisiones calculadas		
Proteína cruda, %	21,44	19,11
Energía neta, MJ/kg	8,88	8,88
SID Lisina g/NE MJ	1,31	1,31
SID Lisina, %	1,16	1,16
SID Metionina, %	0,35	0,35
Fibra detergente neutra, %	20,63	17,93
Calcio, %	0,67	0,68
Fósforo disponible, %	0,22	0,22
¹ La premezcla de vitamina y de minerales traza proporcionó lo siguiente (por kg de dieta): vitamina A, 11.000 IU, vitamina D3, 2.756 IU, vitamina E, 55 IU; vitamina B12, 55 µg; riboflavina, 16.000 mg; ácido pantoténico, 44,1 mg; niacina, 82,7 mg; Zn, 150 mg; Fe, 175 mg; Mn, 60 mg; Cu, 17,5 mg; I, 2 mg y Se, 0,3 mg.		

Las dietas basales respectivas están formuladas para cumplir con las recomendaciones de nutrientes NRC para ganado porcino (NRC, 1998 Tabla 15.1). En cada experimento, se fabrica un lote de la dieta basal y se divide en cuatro porciones y cada porción se mezcla posteriormente con los aditivos identificados en la Tabla 15.2. En el experimento 1, se les ofrece a los cerdos las dietas experimentales durante 42 días, mientras que en el experimento 2 se les ofrecen a los cerdos dietas experimentales de 21 días. La alimentación y el agua están disponibles libremente en todo momento durante la experimentación. Hay 4 rediles réplica por tratamiento en cada experimento; la asignación del redil con los tratamientos es aleatoria basada en el peso corporal del cerdo al inicio del experimento. El peso corporal y la ingesta de alimentos se registran semanalmente y se usan para calcular la relación de conversión de alimento. Los datos de rendimiento de crecimiento (BW, ADFI, ADG y FCR) se someten a un modelo lineal-mixto usando los procedimientos GLM de SAS.

Tabla 15.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa ¹ Xilanasa (FTU/kg de alimento)	
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4	2	500 FTU	2000 U/kg
Control + Xilanasa comercial ²	3	500 FTU	75 ppm
¹ Fitasa de Danisco Animal Nutrition			
² Econasa XT® de AB Vista (algunas veces referida en esta memoria como AB Vista)			

15.2. Resultados y discusión

En comparación con el control, FveXyn4 mejora el aumento de peso del animal tanto en las dietas a base de maíz (Tabla 15.3) como de trigo (Tabla 15.4). Además, FveXyn4 tiene efectos numéricamente superiores en el rendimiento de crecimiento en comparación con la xilanasa alimentaria comercialmente disponible, particularmente en dietas a base de maíz. Esto demuestra la eficacia de FveXyn4 en mitigar los efectos negativos de las fracciones de fibra insoluble y soluble en ingredientes de cereales en el rendimiento de los cerdos y muestra una mejor utilización de la energía contenida en el componente de fibra de los granos de cereales.

Tabla 15.3: Experimento 1: Efecto de la nueva xilanasa en el rendimiento de crecimiento de cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de maíz- DDGS de maíz.

	Peso corporal inicial, kg	Peso corporal final, kg	Consumo de alimento diario promedio, gramos/día	Ganancia diaria promedio, gramos/día	Relación de conversión de alimento, g/g
Control	32,5	68,18b	2285	849b	2,69
FveXyn4	32,9	74,09a	2391	972a	2,46
Xilanasa comercial (Econase® XT)	32,8	71,0ab	2220	909ab	2,43
SEM	0,69	2,18	154	43,5	0,11

Tabla 15.4: Experimento 2: Efecto de la nueva xilanasa en el rendimiento de crecimiento de cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de trigo-salvado de trigo.

	Peso corporal inicial, kg	Peso corporal final, kg	Consumo de alimento diario promedio, gramos/día	Ganancia diaria promedio, gramos/día	Relación de conversión de alimento, g/g
Control	50,5	66,3	2221	753b	2,98a
FveXyn4	49,0	69,1	2332	955a	2,46ab
Xilanasa comercial (Econase® XT)	49,7	69,4	2464	935a	2,66ab
SEM	1,53	1,99	172	56,4	0,24

5 Ejemplo 16

FveXyn4 en alimentación animal – Cerdos

16.1. Materiales y métodos

Se realiza un experimento para evaluar la eficacia de FveXyn4 en dietas a base de trigo/salvado de trigo. El uso de animales y los procedimientos experimentales son aprobados por un Comité de Cuidado Animal y se usaron las pautas de bienestar pertinentes para el país. Las cerdas jóvenes en crecimiento ([Yorkshire x Landrace♀] x ♂ Duroc) se obtienen de una Unidad de Investigación y, a su llegada, los cerdos se pesan y en base al peso corporal asignados aleatoriamente a rediles para dar 8 rediles por tratamiento. Los rediles están equipados con un comedero, un bebedero tipo tetina y suelos de metal expandido cubierto de plástico y una división de pared entre rediles que permite el contacto visual con los cerdos en rediles adyacentes. La temperatura ambiente se mantuvo a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a lo largo de todo el experimento.

Tabla 16.1: Composición de la dieta basal

Item	Nivel
Trigo duro	56,57
Salvado de trigo	5,06
Triturados de trigo	19,94
Harina de soja	13,50
Aceite de soja	0,99
L-Lisina HCl	0,73
DL-Metionina	0,17
L-Treonina	0,30
L-Triptófano	0,01
Marcador de digestibilidad (celite)	0,30

Item	Nivel
Sal	0,47
Caliza	1,38
Fosfato Monocálcico	0,08
Premezcla de vitaminas/minerales traza ¹	0,50
Provisiones calculadas	
Proteína cruda, %	19,11
Energía neta, MJ/kg	8,88
SID Lisina g/NE MJ	1,31
SID Lisina, %	1,16
SID Metionina, %	0,35
Fibra detergente neutra, %	17,93
Calcio, %	0,68
Fósforo disponible, %	0,22
¹ Proporcionado por kg de dieta completa: vitamina A, 8255 IU; vitamina D3, 1000 IU; vitamina E, 20 IU; vitamina K, 1,5 mg; riboflavina, 7,5 mg; niacina, 30 mg; vitamina B12, 25 µg; piridoxina, 4,5 mg; biotina, 200 µg; ácido fólico, 1 mg; tiamina, 4 mg; colina, 781 mg; cobre, 10 mg; yodo, 0,6 mg; hierro, 130 mg; manganeso, 40 mg; selenio, 0,3 mg; zinc, 130 mg.	

5 Se formula una dieta basal para cumplir con las recomendaciones de nutrientes NRC para ganado porcino (NRC, 1998 Tabla 16.1). Se fabrica un lote de la dieta basal y se divide en cuatro porciones y cada porción se mezcla posteriormente con los aditivos identificados en la Tabla 16.2. Los 4 tratamientos se asignan en un diseño completamente al azar para dar 8 rediles por tratamiento. Se les ofrecen a los cerdos las dietas experimentales durante 42 días durante los cuales el alimento y el agua están libremente disponibles en todo momento. El peso corporal y la ingesta de alimentos se registran semanalmente y se usan para calcular la relación de conversión de alimento. Los datos de rendimiento de crecimiento (BW, ADFI, ADG y FCR) se someten a un modelo lineal-mixto usando los procedimientos GLM de SAS.

Tabla 16.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa ¹ (FTU/kg de alimento)	Xilanasa
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4	2	500 FTU	2000 U/kg
Control + Xilanasa comercial ²	3	500 FTU	75 ppm
¹ Fitasa de Danisco Animal Nutrition			
² Econasa XT® de AB Vista (algunas veces referida en esta memoria como AB Vista)			

10 16.2. Resultados y discusión

FveXyn4 da como resultado un mejor aumento de peso corporal, específicamente un 9,9% más de ganancia diaria promedio (más de 42 días) que la xilanasa comercial de AB Vista. Los cerdos mostraron un mejor FCR y un peso corporal final más pesado cuando recibieron FveXyn4.

15 Tabla 16.3: Efecto de la nueva xilanasa en el rendimiento del crecimiento de cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de trigo

	Peso corporal inicial, kg	Peso corporal final, kg	Consumo de alimento diario promedio, gramos/día	Ganancia diaria promedio, gramos/día	Relación de conversión de alimento, g/g
Control	23,9	61,8	2104	904ab	2,33

	Peso corporal inicial, kg	Peso corporal final, kg	Consumo de alimento diario promedio, gramos/día	Ganancia diaria promedio, gramos/día	Relación de conversión de alimento, g/g
FveXyn4	23,0	63,1	2075	954a	2,18
Xilanasa comercial (Econase® XT)	23,2	59,6	2021	868b	2,33
SEM	0,48	1,16	61,2	23,7	0,07

Ejemplo 17

FveXyn4 en alimentos para animales – Cerdos

17.1. Materiales y métodos

- 5 El experimento se realiza para evaluar la eficacia de FveXyn4 sobre la digestibilidad de los nutrientes ileales y la energía en cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de trigo/salvado de trigo. El protocolo para el experimento se revisa y aprueba por un Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales y se usan las pautas de bienestar pertinentes para el país. Para el propósito del experimento, se equipan seis cerdos macho castrados en crecimiento (peso corporal inicial de 30 kg) con una cánula T en el íleon distal. Los cerdos son las crías de cerdos G-Performer que se aparearon con 25 hembras Fertiliium (Genetiporc, Alexandria, MN, EE.UU.) y se alojan en rediles individuales (1,2 x 1,5) en una habitación con control ambiental. Cada redil está equipado con un comedero y un bebedero tipo tetina y tiene suelos de hormigón completamente de listones.
- 10

Tabla 17.1: Composición de la dieta basal

Item	Nivel
Trigo duro	56,57
Salvado de trigo	5,06
Triturados de trigo	19,94
Harina de soja	13,50
Aceite de soja	0,99
L-Lisina HCl	0,73
DL-Metionina	0,17
L-Treonina	0,30
L-Triptófano	0,01
Marcador de digestibilidad (celite)	0,30
Sal	0,47
Caliza	1,38
Fosfato Monocálcico	0,08
Premezcla de vitaminas/minerales traza ¹	0,50
Provisiones calculadas	
Proteína cruda, %	19,11
Energía neta, MJ/kg	8,88
SID Lisina g/NE MJ	1,31
SID Lisina, %	1,16
SID Metionina, %	0,35
Fibra detergente neutra, %	17,93
Calcio, %	0,68

Item	Nivel
Fósforo disponible, %	0,22
¹ Se proporcionaron las siguientes cantidades de vitaminas y de minerales traza por kilogramo de dieta completa: Vitamina A como acetato de retinol, 11.128 IU; vitamina D3 como colecalciferol, 2.204 IU; vitamina E como DL-alfa tocoferil acetato, 66 IU; vitamina K como bisulfito de menadiona nicotinamida, 1,42 mg; tiamina como mononitrato de tiamina, 0,24 mg; riboflavina, 6,58 mg; piridoxina como hidrocloreto de piridoxina, 0,24 mg; vitamina B12, 0,03 mg; ácido pantoténico como D-calcio pantotenato, 23,5 mg; niacina como nicotinamida y ácido nicotínico, 44 mg; ácido fólico, 1,58 mg; biotina, 0,44 mg; Cu, 10 mg como sulfato de cobre; Fe, 125 mg como sulfato de hierro; I, 1,26 mg como yoduro potásico; Mn, 60 mg como sulfato de manganeso; Se, 0,3 mg como selenito sódico y Zn, 100 mg como óxido de zinc.	

Tabla 17.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa ¹ (FTU/kg de alimento)	Xilanasa
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4	2	500 FTU	2000 U/kg
Control + Xilanasa comercial ²	3	500 FTU	75 ppm
¹ Fitasa de Danisco Animal Nutrition ² Econasa XT® de AB Vista			

- Se formula una dieta basal para cumplir con las recomendaciones de nutrientes NCR para ganado porcino (Tabla 17.1). Se fabrica un lote de la dieta basal y se divide en cuatro porciones y cada porción se mezcla posteriormente con los aditivos identificados en la Tabla 17.2. El experimento se diseñó y realizó de acuerdo con un diseño de un cuadrado latino 4 x 4 con dos columnas añadidas para dar 6 réplicas por dieta. Todos los cerdos se alimentaron a un nivel de 3 veces su requerimiento de energía de mantenimiento (106 kcal ME por Kg^{0,75}; NRC, 1998) y se proporcionan a 0800 y a 1700 h. Los animales tienen acceso libre al agua a través de un bebedero tipo cuenco. Los pesos de los cerdos se registran al principio y al final de cada periodo y se registra la cantidad de alimento suministrado cada día. Cada periodo experimental duró 7 días. Los 5 días iniciales de cada periodo se consideran un periodo de adaptación a la dieta. La digestión en el íleon se recogió durante 8 h en los días 6 y 7 usando procedimientos operativos estándar. En resumen, se une una bolsa de plástico al cañón de la cánula y se recoge el bolo alimentario que fluye dentro de la bolsa. Las bolsas se retiran cada vez que se llenan con bolo alimentario - o al menos una vez cada 30 minutos y se congelan inmediatamente a -20°C. Al finalizar un periodo experimental, los animales se ven privados de alimento durante la noche y, a la mañana siguiente, se ofrece una nueva dieta experimental.
- Al final del experimento, las muestras ileales se descongelan, se mezclan dentro del animal y de la dieta y se recoge una sub-muestra para análisis químico. Se recoge y se analiza también una muestra de dieta basal. Las muestras de bolo alimentario se liofilizan y se muelen finamente antes del análisis químico. Todas las muestras se analizan en busca de materia seca, titanio, energía bruta, proteína bruta, grasa y fibra detergente neutra de acuerdo con los procedimientos estándar (AOAC, 2005). Los valores para la digestibilidad del íleon aparente de energía y nutrientes se calculan como se describió anteriormente (Stein et al., 2007 Livestock Science, 2007 vol. 109, número 1, parte 3, págs. 282-285 y J ANIM SCI enero 2007 vol. 85 n°. 1 172-180). Los datos se analizan usando los procedimientos MIXTOS de SAS.

17.2. Resultados y discusión

- Los resultados indican que los cerdos alimentados con FveXyn4 tienen una digestibilidad ileal aparente significativamente mayor (P<0,05) de la proteína y grasa crudas que los cerdos control y alimentados con xilanasa comercial (Tabla 17.3). Los resultados sugieren que FveXyn4 es eficaz en desbloquear la energía en alimentos con fibra que se dan a cerdos en crecimiento al romper las fibras. De hecho, los cerdos alimentados con FveXyn4 muestran un aumento de digestibilidad en un intervalo de 6 a 11 unidades porcentuales en relación con la control y la xilanasa comercial (Tabla 17.3). Posteriormente, los cerdos alimentados con FveXyn4 obtuvieron 106 y 219 kcal de energía extra (Tabla 17.3) en comparación con cerdos alimentados con el control y la xilanasa comercial, respectivamente.

Tabla 17.3: Efecto de la nueva xilanasa sobre los nutrientes ileales aparentes y la digestibilidad energética de la fibra (%) y utilización de energía (kcal/kg) en cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de trigo

	Materia seca	Proteína cruda	Grasa	Fibra detergente neutra	Energía
Control	68,0ab	74,7b	62,2b	66,3ab	3,168ab

	Materia seca	Proteína cruda	Grasa	Fibra detergente neutra	Energía
FveXyn4	71,2a	77,0a	67,7a	72,1a	3,274a
Xilanasa comercial (Econase® XT)	65,8b	74,6b	56,3b	61,3b	3,055b
SEM	1,44	0,84	2,03	2,65	47,6

Ejemplo 18

FveXyn4 en alimentos para animales – Cerdos

18.1. Materiales y métodos

5 Se estudia la eficacia de FveXyn4 en los nutrientes del tracto ileal y totales y la digestibilidad energética en cerdos en crecimiento alimentados con dietas a base de maíz-DDGS de maíz y trigo/salvado de trigo. Un Comité de Cuidado y Uso Animal aprueba el uso de los cerdos y los cerdos se cuidan de acuerdo con las pautas de bienestar pertinentes para el país. Un total de 24 cerdos macho castrados ([♀ Yorkshire x Landrace] x ♂ Duroc; peso corporal inicial de 30 kg) se equipan con una cánula T en el íleon distal para el propósito del experimento. Los cerdos se alojan individualmente en cajones de metabolismo que tienen lados de plástico transparentes lisos y suelos de chapa metálica cubierta de plástico en una habitación con temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$).

10

Tabla 18.1: Dietas basales usadas

Item	A base de maíz	A base de trigo
Maíz	41,44	
DDGS de maíz de EE.UU.	40,0	
Trigo duro		56,57
Salvado de trigo		5,06
Triturados de trigo		19,94
Harina de soja	15,00	13,50
Sebo		0,99
L-Lisina HCl	0,75	0,73
DL-Metionina	0,10	0,17
L-Treonina	0,25	0,30
L-Triptófano	0,06	0,01
Marcador de digestibilidad (celite)	0,30	0,30
Sal	0,30	0,47
Caliza	1,30	1,38
Fosfato Monocálcico	0,00	0,08
Premezcla de vitaminas/minerales traza ¹	0,50	0,50
Provisiones calculadas		
Proteína cruda, %	21,44	19,11
Energía neta, MJ/kg	8,88	8,88
SID Lisina g/NE MJ	1,31	1,31
SID Lisina, %	1,16	1,16
SID Metionina, %	0,35	0,35
Fibra detergente neutra, %	20,63	17,93
Calcio, %	0,67	0,68

Item	A base de maíz	A base de trigo
Fósforo disponible, %	0,22	0,22
¹ La premezcla de vitamina y de minerales traza proporcionó lo siguiente (por kg de dieta): vitamina A, 11.000 IU, vitamina D3, 2.756 IU, vitamina E, 55 IU; vitamina B12, 55 µg; riboflavina, 16.000 mg; ácido pantoténico, 44,1 mg; niacina, 82,7 mg; Zn, 150 mg; Fe, 175 mg; Mn, 60 mg; Cu, 17,5 mg; I, 2 mg y Se, 0,3 mg.		

Las dietas basales respectivas están formuladas para cumplir con las recomendaciones de nutrientes NRC para ganado porcino (NRC, 1998 Tabla 18.1). En cada experimento, se fabrica un lote de la dieta basal y se divide en cuatro porciones y cada porción se mezcla posteriormente con los aditivos identificados en la Tabla 18.2.

Tabla 18.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa ¹ (FTU/kg de alimento)	Xilanasa
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4	2	500 FTU	4000 U/kg
Control + Xilanasa comercial ²	3	500 FTU	100 ppm
¹ Fitasa de Danisco Animal Nutrition			
² Econasa XT® de AB Vista			

5 El experimento se diseña y se lleva a cabo como un diseño cruzado de dos periodos en los que todas las dietas de maíz se ejecutan en el periodo uno y todas las dietas de trigo se ejecutan en el periodo dos. Dentro de un periodo, los 4 tratamientos se asignarán a los cerdos en un diseño completamente al azar para dar 6 réplicas por tratamiento. Los cerdos se alimentan con una dieta comercial común durante una semana antes del comienzo del segundo periodo. Los cerdos se alimentan con sus dietas respectivas en dos porciones iguales a las 0830 y a las 1630. La asignación diaria de alimento se basa en el peso corporal del cerdo al comienzo del periodo y se calcula para suministrar 2,6 veces los requisitos de mantenimiento estimados. Cada periodo experimental dura 14 d: d 7 para la adaptación, d 8 y 9 para la recogida fecal con paleta y d 10 y 11 para la recogida del bolo alimentario ileal para examinar el coeficiente de digestibilidad aparente del tracto ileal y total de N, DM, energía y grasa cruda. Se permite que los cerdos tengan acceso libre al agua de los bebederos de tetina ubicados en cada redil en todo momento. Las mediciones de flujo de bolo alimentario y las muestras de sangre se llevan a cabo del d 12 al 14. Los datos se analizan usando procedimientos GLM de SAS. Se acepta la significancia estadística a P<0,05.

18.2. Resultados y discusión

Resultados preliminares indican que los cerdos alimentados con FveXyn4 han mejorado significativamente la digestibilidad energética.

20 Ejemplo 19

FveXyn4 en alimentos para animales (Aves de corral)

19.1. Materiales y métodos

25 Se realiza un experimento para evaluar la eficacia de FveXyn4 en el rendimiento del crecimiento de pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz/DDGS de maíz y dietas a base de trigo/salvado de trigo. Los procedimientos experimentales se aprueban por el Comité de Ética Animal y cumplen con las pautas de bienestar relevantes para el país. Se usa un programa de alimentación de inicio y de finalización de dos fases (iniciador y finalizador) (Tabla 1). Las dietas de inicio y de finalización se ofrecen desde d 0 a 21 y 22 a 42, respectivamente.

Tabla 19.1: Composición de las dietas basales¹

	Inicio, d 0-21		Finalización, d 22-42	
	Maíz	Trigo	Maíz	Trigo
Maíz	57,39	-	58,50	-
DDGS de maíz	11,00	-	15,00	-
Trigo	-	60,17	-	63,30
Salvado de trigo	-	9,00	-	13,00

ES 2 734 145 T3

	Inicio, d 0-21		Finalización, d 22-42	
	Maíz	Trigo	Maíz	Trigo
Harina de soja, 45%	26,50	22,34	19,00	14,00
Sebo	1,75	4,85	3,20	5,95
Premezcla vitaminas-minerales ²	0,33	0,33	0,33	0,33
Bicarbonato sódico	0,20	0,22	0,20	0,29
Sal	0,38	0,38	0,34	0,35
Fosfato monocálcico	0,35	0,37	0,13	0,20
Caliza	1,700	1,69	1,70	1,65
L-Lisina-HCl	0,135	0,25	0,20	0,34
DL-metionina	0,185	0,23	0,13	0,19
L-treonina	0,100	0,19	0,09	0,22
Provisiones calculadas				
Proteína cruda	21,0	21,1	18,6	18,2
ME (MJ/kg)	12,5	12,2	12,9	12,5
Calcio	0,81	0,80	0,75	0,73
Fósforo disponible	0,25	0,25	0,21	0,21
Sodio	0,23	0,22	0,23	0,22
Lisina digerible	1,01	0,99	0,90	0,87
Metionina digerible	0,47	0,47	0,39	0,39
Treonina digerible	0,74	0,74	0,64	0,66
Triptófano digerible	0,19	0,21	0,16	0,17
¹ Una fitasa comercial de Danisco Animal Nutrition se preparó para suministrar 500 FTU/kg de alimento final ² Se suministra por kilogramo de dieta: antioxidante, 100 mg; biotina, 0,2 mg; pantotenato de calcio, 12,8 mg; colecalciferol, 60 µg; cianocobalamina, 0,017 mg; ácido fólico, 5,2 mg; menadiona, 4 mg; niacina, 35 mg; piridoxina, 10 mg; transretinol, 3,33 mg; riboflavina, 12 mg; tiamina, 3,0 mg; dl-α-tocoferil acetato, 60 mg; cloruro de colina, 638 mg; Co, 0,3 mg; Cu, 3,0 mg; Fe, 25 mg; I, 1 mg; Mn, 125 mg; Mo, 0,5 mg; Se, 200 µg; Zn, 60 mg.				

Dos dietas básicas, una a base de trigo/salvado de trigo y harina de soja y la otra a base de maíz/DDGS de maíz y harina de soja se formulan para cumplir o superar los requisitos recomendados para nutrientes, excepto AME, para pollos de engorde (Tabla 19.1). A partir de cada dieta basal, se desarrollan cuatro dietas experimentales para constituir el control, FveXyn4, xilanasas comerciales 1 y xilanasas comerciales 2, como se identifican en la Tabla 19.2.

5

Tabla 19.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa ¹ (FTU/kg de alimento)	Xilanasas
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4	2	500 FTU	1250 U/kg
Control + Xilanasas comercial ²	3	500 FTU	50 ppm
¹ Fitasa de Danisco Animal Nutrition ² Econasa XT® de AB Vista			

Los pollos machos de engorde (Ross 308) se obtienen como crías de un día de un criadero comercial. Los pollitos se pesan individualmente y se asignan a 72 jaulas incubadoras (8 pollitos por jaula) y los 8 tratamientos dietéticos se asignan al azar a ocho jaulas cada uno. En el día 12, las aves se transfieren a jaulas productoras. La asignación de espacio por ave en las jaulas incubadoras y productoras es de 530 y 640 cm², respectivamente. Las jaulas incubadoras

y productoras se colocan en habitaciones con control ambiental. La temperatura se mantiene a 31°C en la primera semana y luego se reduce gradualmente a 22°C al final de la tercera semana. Las aves reciben 20 horas de iluminación fluorescente y se les permite libre acceso a las dietas y al agua. Los pesos corporales y la ingesta de alimento se registran a intervalos semanales durante el periodo experimental de 42 días. La mortalidad se registra diariamente. Cualquier ave que muere se pesa y el peso se usa para ajustar FCR. Las relaciones de conversión de alimento se calculan dividiendo el consumo total de alimento por el aumento de peso de aves vivas más muertas. Los datos se analizan como una disposición factorial bidireccional de los tratamientos usando el procedimiento de Modelos Lineales Generales de SAS (2004).

19.2. Resultados y discusión

En comparación con el control y la xilanasa comercial 2, FveXyn4 mejora la ganancia y el FCR en las dietas a base tanto de maíz como de trigo (Tabla 19.3). Esto demuestra la eficacia de FveXyn4 para mitigar los efectos negativos de las fracciones de fibra insoluble y soluble en los ingredientes de cereales que pueden limitar el rendimiento de las aves de corral.

Tabla 19.3: Efecto de la nueva xilanasa en el rendimiento de crecimiento de pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz/DDGS de maíz y trigo/salvado de trigo

Tratamientos		Peso corporal inicial, kg	Peso corporal final, kg	Ingesta de alimento, g	Ganancia diaria de peso corporal, g	Relación de conversión de alimento, g/g
Grano	Xilanasa					
Maíz	Control	38,3	2151	3738	2113	1,81
Maíz	FveXyn4	38,3	2306	3946	2268	1,76
Maíz	Xilanasa comercial	38,5	2304	3969	2265	1,78
Trigo	Control	38,4	2477	4056	2438	1,72
Trigo	FveXyn4	38,3	2678	4294	2639	1,69
Trigo	Xilanasa comercial	38,2	2456	4077	2418	1,71
SEM		0,17	56,5	105	56,5	0,02
Principales efectos, granos						
Maíz		38,3	2252b	3851b	2214b	1,77a
Trigo		38,3	2588a	4165a	2550a	1,68b
SEM		0,09	28,2	52,5	28,2	0,01
Principales efectos, xilanasas						
Control		38,3	2314b	3847	2275b	1,76a
FveXyn4		38,3	2492a	4120	2453a	1,72b
Xilanasa comercial		38,3	2380b	4023	2342b	1,74ab
SEM		0,12	39,9	74,3	39,9	0,01
Probabilidades						
Grano		-	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Xilanasa		-	<0,01	0,22	<0,01	<0,01
Interacción grano y xilanasa		-	0,04	0,37	0,04	0,05

Dentro de una columna, las medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0,05).

Ejemplo 20

FveXyn4 en alimentos para animales (Aves de corral)

20.1. Materiales y métodos

5 El experimento se realiza para evaluar la eficacia de FveXyn4 en la utilización/retención de energía y nutrientes en pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz/DDGS de maíz. Un Comité de Cuidado y Uso de Animales aprobó todos los procedimientos de manejo y recogida de las aves. Doscientos cincuenta y seis pollos de engorde machos (Ross 708, Aviagen, Huntsville, AL) se alojaron en jaulas de baterías calentadas eléctricamente (modelo SB 4 T, Alternative Design Manufacturing, Siloam Springs, AR) en una habitación con control ambiental durante 21 días de ensayo. Las temperaturas de la batería en d 1 a 8, d 8 a 15 y d 15 a 21 se mantienen a 35, 32 y 27°C, respectivamente.

10 Se formula una dieta a base de maíz (Tabla 20.1) para cumplir con los requisitos de nutrientes de los pollos de engorde. A partir de la dieta basal, se desarrollaron cuatro dietas experimentales para constituir el control, FveXyn4 y la xilanas comercial como se identifica en la Tabla 20.2.

Tabla 20.1: Composición de la dieta basal

Ingredientes, g/kg	Niveles
Maíz	554,4
DDGS-maíz	110,0
Harina de soja	244,4
Aceite de soja	10,0
L-Lisina HCl	4,3
DL-Metionina	2,7
L-Treonina	1,1
Bicarbonato sódico	2,0
Sal	2,2
Caliza (A)	15,3
MCP (B)	5,6
Premezcla vitaminas-minerales (C)	3,0
Premezcla TiO ₂ (D)	25,0
Premezcla de fitasa (E)	10,0
Provisiones calculadas	
Proteína cruda, g/kg	211,4
MEP, MJ/kg	115,1
Calcio, g/kg	8,9
Fósforo disponible, g/kg	2,8
Lisina digerible, g/kg	11,5
Metionina digerible, g/kg	5,5
A. Ca 38%	
B. Ca 16%, P 21%	
C. Suministra los siguientes por kg de DIETA: Vit. A, 5484 IU; Vit. D3, 2643 ICU; Vit E, 11 IU; bisulfito de sodio menadiona, 4,38 mg; riboflavina, 5,49 mg; ácido d-pantoténico, 11 mg; Niacina, 44,1 mg; Cloruro de colina, 771 mg; Vit B12, 13,2 µg; Biotina, 55,2 µg; Mononitrato de tiamina, 2,2 mg; Ácido fólico, 990 µg; Hidrocloruro de piridoxina, 3,3 mg; I, 1,11 mg; Mn, 66,06 mg; Cu, 4,44 mg; Fe, 44,1 mg; Zn, 44,1 mg; Se, 300 µg. También contiene por g de premezcla: Vit. A, 1828 IU; Vit. D3, 881 ICU; Vit. E, 3,67 IU; Bisulfito de sodio menadiona, 1,46 mg; Riboflavina, 1,83 mg; ácido d-pantoténico, 3,67 mg; Niacina, 14,69 mg; Cloruro de colina, 257 mg; Vit B12, 4,4 µg; Biotina, 18,4 µg; Mononitrato de tiamina, 735 µg; Ácido fólico, 330 µg; Hidrocloruro de piridoxina, 1,1 mg; I, 370 µg; Mn, 22,02 mg; Cu, 1,48 mg; Fe, 14,69 mg; Zn, 14,69 mg; Se, 100 µg.	
D. Preparado como 5 g de TiO ₂ añadido a 20 g de SBM molido fino.	
E. Preparado como 0,2 g de fitasa añadida a 9,8 g de SBM molido fino.	

Tabla 20.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa ¹ (FTU/kg de alimento)	Xilanasas
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4	2	500 FTU	1250 U/kg
Control + Xilanasas comercial ²	3	500 FTU	50 ppm
¹ Fitasa de Danisco Animal Nutrition			
² Econasa XT® de AB Vista			

Al llegar al centro de investigación, los pollitos se pesan, se agrupan en 4 bloques por bloques y se asignan al azar a 4 grupos dietéticos en cada bloque con 8 aves por jaula en un diseño de bloques completos al azar. Los pollitos se alimentan *ad libitum* con dietas experimentales (papilla) de 1 d y se les deja *ad libitum* el acceso al agua potable limpia. Los excrementos se recogen dos veces al día los días 19, 20 y 21 después de la eclosión. Durante la recogida, se coloca papel encerado en bandejas debajo las jaulas y se recolectan los excrementos en el papel encerado. Las muestras de excrementos recolectados se agrupan por jaula a lo largo de los 3 días, se almacenan en un congelador, se secan y se muelen para pasar a través de un tamiz de 0,5 mm usando un molinillo (Retsch ZM 100, GmbH & Co. K. C., Haan, Alemania). Las muestras de excrementos de dietas se analizan para determinar la energía bruta, materia seca, grasa y fibra detergente neutra usando procedimientos estándar (AOAC, 2005) para el cálculo de retenciones aparentes y AME. Los datos se sometieron posteriormente a procedimientos GLM de SAS.

20.2. Resultados y discusión

Las aves alimentadas con FveXyn4 retienen más grasa y fibra y posteriormente extrajeron más energía (~57 kcal/kg) en comparación con las aves alimentadas control (Tabla 6). Además, las aves alimentadas con FveXyn4 tienen una retención de fibra significativamente mayor en comparación con la xilanasas comercial.

Tabla 20.3: Efecto de la nueva xilanasas en la retención aparente de nutrientes y de fibra (%) e utilización de energía (kcal/kg) en pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz-DDGS de maíz

	Materia seca	Proteína cruda	Grasa	Fibra detergente neutra	Energía
Control	67,5ab	60,4	51,6b	27,4b	3107b
FveXyn4	68,2ab	60,1	57,8a	30,1a	3164a
Xilanasas comercial (Econase® XT)	68,8a	60,5	52,2ab	26,8b	3156ab
SEM	0,48	0,91	2,05	1,15	21,8

Dentro de una columna, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes, (P<0,05).

Ejemplo 21

20 FveXyn4 en alimentos para animales (Aves de corral)

21.1. Materiales y métodos

Se realiza un experimento para evaluar la eficacia de FveXyn4 en la utilización y retención de energía y nutrientes en pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz/DDGS de maíz.

El experimento se aprueba por un Comité de Experimentación Animal y se ajusta al protocolo requerido por las regulaciones pertinentes. Las aves se asignan a tratamientos dietéticos cuando tienen 14 días de edad. A la edad de un día, las aves se crían juntas y reciben una dieta pre-experimental de harina de maíz-soja comercial. El experimento se lleva a cabo en una habitación con control ambiental.

Tabla 21.1: Composición de la dieta basal

Ingrediente, g/kg	Nivel
Maíz	54,4
DDGS-maíz	11,0

Ingrediente, g/kg	Nivel
Harina de soja	28,9
Aceite de soja	1,0
L-Lisina HCl	0,43
DL-Metionina	0,27
L-Treonina	0,11
Bicarbonato sódico	0,20
Sal	0,22
Caliza	1,53
Fosfato monocálcico	0,56
Premezcla vitaminas-minerales	1,0
Dióxido de titanio	0,30
Provisiones calculadas	100
Proteína cruda, %	21,1
MEP, MJ/kg	11,5
Calcio, %	0,89
Fósforo disponible	0,28
Lisina digerible	1,15
Metionina digerible	0,55

La premezcla proporcionó (dietas unidades Kg⁻¹): Vit A 16.000 iu; Vit D3 3.000 iu; Vit E 75 iu; Vit B₁ 3 mg; Vit B₂ 10 mg; Vit B₆ 3 mg; Vit B₁₂ 15 µg; Vit K₃ 5 mg; Ácido nicotínico 60 mg; Ácido pantoténico 14,5 mg; Ácido fólico 1,5 mg; Biotina 275 µg; Cloruro de colina 250 mg; Hierro 20 mg; Cobre 10 mg; Manganeseo 100 mg; Cobalto 1 mg; Zinc 82 mg; Yodo 1 mg; Selenio 0,2 mg; Molibdeno 0,5 mg.

5

Tabla 21.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa ¹ (FTU/kg de alimento)	Xilanasa
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4	2	500 FTU	1250 U/kg
Control + Xilanasa comercial ²	4	500 FTU	50 ppm
¹ Fitasa de Danisco Animal Nutrition			
² Econasa XT® de AB Vista			

10

15

Se formula una dieta basal a base de maíz (Tabla 21.1) para cumplir con los requisitos de nutrientes del pollo de engorde. A partir de la dieta basal, se desarrollan cuatro dietas experimentales para constituir el control, FveXyn4 y la xilanasa comercial como se identifican en la Tabla 21.2. Ciento noventa y dos aves de 14 días de edad se etiquetan y se asignan a 4 tratamientos con 8 jaulas de réplica por tratamiento y 6 aves por jaula de réplica. El diseño experimental es un bloque completo aleatorio con bloques asignados aleatoriamente a espacios dentro de una habitación. Las aves se alimentan con dietas experimentales a partir del día 14 hasta el día 21. Se proporciona agua de la red *ad libitum* a las aves. Los excrementos totales no válidos se recogen en los días 19 a 21. Esto permita el cálculo de la retención aparente del tracto total usando la recogida total. Los excrementos se secan en un horno de aire forzado antes de los análisis químicos. Las dietas y excrementos se analizan químicamente. La materia seca (DM) se determina secando en un horno de tiro forzado a 100°C durante 24 horas. La grasa cruda se determina usando el sistema extractor Soxhlet (AOAC 920.39). El contenido de nitrógeno se determina por el método de combustión usando un sistema Leco (Sweeney, 1998). El titanio se determina usando el método de Short et al. (1996). La energía bruta se determina en un calorímetro adiabático. Los datos se someten posteriormente a procedimientos GLM de SAS.

21.2. Resultados y discusión

5 En comparación con el control, FveXyn4 aumenta ($P < 0,05$) la retención de materia seca, proteína cruda y grasa (Tabla 21.3) en una dieta a base de maíz-DDGS de maíz. Además, FveXyn4 tiene una mayor retención de materia seca, proteínas y grasa en comparación con la xilanasa alimentaria comercialmente disponible. Esto demuestra la eficacia de FveXyn4 para mitigar los efectos negativos de las fracciones de fibra insoluble y soluble en el grano de maíz y en los co-productos de maíz. De hecho, la adición de FveXyn4 en la dieta control produce un aumento significativo de energía de 116 kcal/kg.

Tabla 21.3: Efecto de la nueva xilanasa en la retención aparente de nutrientes y de fibra (%) e utilización de energía (kcal/kg) en pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz- DDGS de maíz

	Materia seca	Proteína cruda	Grasa	Energía
Control	73,5bc	69,2ab	76,1b	3431b
FveXyn4	76,1a	72,2a	79,6a	3547a
Xilanasa comercial (Econase® XT)	72,7c	66,2b	78,9ab	3428b
SEM	0,70	1,32	1,12	30,6

10 Dentro de una columna, las medias con diferentes letras son significativamente diferentes, ($P < 0,05$).

Ejemplo 22

FveXyn4 en alimentos para animales (Aves de corral)

22.1. Materiales y métodos

15 Se realiza un experimento para evaluar la eficacia de la respuesta a la dosis de FveXyn4 en el rendimiento de crecimiento de pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz/ DDGS de maíz y de trigo/salvado de trigo. Los procedimientos experimentales se aprueban por el Comité Institucional de Ética Animal y cumplen con las pautas de bienestar pertinentes del país. Se usa un programa de alimentación de dos fases (iniciador y finalizador) (Tabla 22.1). Las dietas de inicio y de finalización se ofrecen a partir de d 0 a 21 y de 22 a 42, respectivamente.

Tabla 22.1: Composición de las dietas basales¹

	Inicio, d 0-21		Finalización, d 22-42	
	Maíz	Trigo	Maíz	Trigo
Maíz	57,39	-	58,50	-
DDGS de maíz	11,00	-	15,00	-
Trigo	-	60,17	-	63,30
Salvado de trigo	-	9,00	-	13,00
Harina de soja, 45%	26,50	22,34	19,00	14,00
Sebo	1,75	4,85	3,20	5,95
Premezcla vitaminas-minerales ²	0,33	0,33	0,33	0,33
Bicarbonato sódico	0,20	0,22	0,20	0,29
Sal	0,38	0,38	0,34	0,35
Fosfato monocálcico	0,35	0,37	0,13	0,20
Caliza	1,700	1,69	1,70	1,65
L-Lisina-HCl	0,135	0,25	0,20	0,34
DL-metionina	0,185	0,23	0,13	0,19
L-treonina	0,100	0,19	0,09	0,22
Provisiones calculadas				

	Inicio, d 0-21		Finalización, d 22-42	
	Maíz	Trigo	Maíz	Trigo
Proteína cruda	21,0	21,1	18,6	18,2
ME (MJ/kg)	12,5	12,2	12,9	12,5
Calcio	0,81	0,80	0,75	0,73
Fósforo disponible	0,25	0,25	0,21	0,21
Sodio	0,23	0,22	0,23	0,22
Lisina digerible	1,01	0,99	0,90	0,87
Metionina digerible	0,47	0,47	0,39	0,39
Treonina digerible	0,74	0,74	0,64	0,66
Triptófano digerible	0,19	0,21	0,16	0,17

¹ Fitasa B comercial de Danisco Animal Nutrition se preparó para suministrar 500 FTU/kg de alimento final

² Se suministra por kilogramo de dieta: antioxidante, 100 mg; biotina, 0,2 mg; pantotenato de calcio, 12,8 mg; colecalciferol, 60 µg; cianocobalamina, 0,017 mg; ácido fólico, 5,2 mg; menadiona, 4 mg; niacina, 35 mg; piridoxina, 10 mg; transretinol, 3,33 mg; riboflavina, 12 mg; tiamina, 3,0 mg; dl- α -tocoferil acetato, 60 mg; cloruro de colina, 638 mg; Co, 0,3 mg; Cu, 3,0 mg; Fe, 25 mg; I, 1 mg; Mn, 125 mg; Mo, 0,5 mg; Se, 200 µg; Zn, 60 mg.

Se formulan dos dietas básicas, una a base de trigo/salvado de trigo y harina de soja y la otra a base de maíz/DDGS de maíz y harina de soja, para cumplir o exceder los requisitos recomendados para nutrientes, excepto AME, para pollos de engorde (Tabla 22.1). A partir de cada dieta basal, se desarrollan tres dietas experimentales para constituir el control, 3 dosis de FveXyn4 y xilanasa comercial como se identifica en la Tabla 22.2.

5

Tabla 22.2: Identificación de tratamientos

Dieta	Tratamiento ID	Fitasa (FTU/kg de alimento)	Xilanasa
Control	1	500 FTU	0
Control + FveXyn4 dosis 1	2	500 FTU	1250 U/kg
Control + FveXyn4 dosis 2	3	500 FTU	2500 U/kg
Control + FveXyn4 dosis 3	4	500 FTU	5000 U/kg
Control + Xilanasa comercial ¹	5	500 FTU	100 ppm

¹ AB Vista

10

15

Los pollitos de engorde macho (Ross 308) se obtienen como de un día de edad de un criadero comercial. Los pollitos se pesan individualmente y se asignan a 60 jaulas incubadoras (8 pollitos por jaula) y los 10 tratamientos dietéticos asignados aleatoriamente a seis jaulas cada uno. En el día 12, las aves se transfieren a jaulas productoras. La asignación de espacio por ave en las jaulas incubadoras y productoras es de 530 y 640 cm², respectivamente. Las jaulas incubadoras y productoras se alojan en habitaciones con control ambiental. La temperatura se mantiene a 31°C en la primera semana y luego se reduce gradualmente a 22°C al final de la tercera semana. Las aves reciben 20 horas de iluminación fluorescente y se les permitió el libre acceso a las dietas y al agua. Se registran los pesos corporales y la ingesta de alimento a intervalos semanales durante el periodo experimental de 42 días. La mortalidad se registra diariamente. Cualquier ave que muera se pesa y el peso se usa para ajustar FCR. Las relaciones de conversión de alimentación se calculan dividiendo la ingesta total de alimento entre el aumento de peso de aves vivas más muertas. Los datos se analizan como una disposición factorial bidireccional de los tratamientos usando el procedimiento de modelos Lineales Generales de SAS (2004).

22.2. Resultados y discusión

20

En comparación con el control y la xilanasa comercial, FveXyn4 mejora la eficiencia de conversión de la alimentación de una manera dependiente de la dosis tanto en las dietas a base de maíz como de trigo (Tabla 22.3). Estas observaciones sugirieron que el mayor valor de la xilanasa se deriva de una tasa de inclusión más alta. Esto demuestra la eficacia de FveXyn4 para mitigar los efectos negativos de las fracciones de fibra insoluble y soluble en los ingredientes de cereales que pueden limitar la capacidad de las aves de corral para utilizar nutrientes de la dieta para respaldar el rendimiento del crecimiento.

ES 2 734 145 T3

Tabla 22.3: Efecto dosis respuesta de la nueva xilanasa en el rendimiento del crecimiento de pollos de engorde alimentados con dietas a base de maíz/DDGS de maíz y de trigo/salvado de trigo

Tratamientos		Peso corporal inicial, kg	Peso corporal final, kg	Ingesta de alimento, g	Ganancia de peso corporal, g	Relación de conversión de alimento, g/g
Grano	Xilanasa					
Maíz	Control	33,50	2569	4162	2536	1,726
Maíz	FveXyn4-Dosis 1	33,54	2584	4335	2551	1,708
Maíz	FveXyn4-Dosis 2	33,65	2585	4224	2552	1,671
Maíz	FveXyn4-Dosis 3	33,54	2580	4177	2546	1,683
Maíz	Xilanasa comercial 2	33,98	2646	4295	2612	1,677
Trigo	Control	33,56	2508	4456	2474	1,824
Trigo	FveXyn4-Dosis 1	33,98	2485	4285	2451	1,814
Trigo	FveXyn4-Dosis 2	33,63	2674	4413	2641	1,656
Trigo	FveXyn4-Dosis 3	33,81	2707	4330	2673	1,629
Trigo	Xilanasa comercial 2	34,13	2590	4297	2556	1,694
SEM		0,22	55,2	56,6	91,3	56,5
Principales efectos, granos						
Maíz		33,64	2593	4238b	2559	1,693
Trigo		33,82	2593	4356a	2559	1,723
SEM		0,10	25,30	40,82	25,28	0,018
Principales efectos, xilanasas						
Control		33,53	2539	4309	2505	1,775a
FveXyn4-Dosis 1		33,76	2535	4310	2501	1,761ab
FveXyn4-Dosis 2		33,64	2630	4318	2596	1,664c
FveXyn4-Dosis 3		33,68	2643	4254	2610	1,656c
Xilanasa comercial 2		34,05	2618	4296	2584	1,686bc
SEM		0,152	40,00	64,55	39,98	0,028
Probabilidades						
Grano		-	0,993	0,046	0,989	0,237
Xilanasa		-	0,165	0,958	0,166	0,008
Interacción grano y xilanasa		-	0,190	0,329	0,189	0,212

Dentro de una columna, las medias con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0,05).

Ejemplo 23

5 FveXyn4 en combinación con proteasa

Se investigó el efecto de FveXyn4 en combinación con proteasa en la solubilización de pentosano y proteína a partir de DDGS insoluble preparado.

23.1. Materiales y métodos

Muestras de enzima

5 La xilanasa usada en este estudio es una nueva xilanasa GH10 de *Fusarium verticilloides* (denominada FveXyn4) expresada en *Trichoderma reesei* en donde se usó la xilanasa en forma purificada – esta enzima se puede denominar en esta memoria como FveXyn4.

La proteasa usada en este estudio es el producto Multifect P-3000 (disponible de Danisco Animal Nutrition). La preparación de proteasa se realizó justo antes de las cargas. Se diluyó la cantidad adecuada de solución madre en agua MQ enfriada y se mezcló mientras se mantenía en hielo. Se definió una unidad de proteasa (U) como la liberación de 1,0 µg de compuesto fenólico (expresado como equivalentes de tirosina) de un sustrato de caseína por minuto.

10 Preparación de sustrato

15 Para la preparación de sustrato DDGS insoluble, se realizó la eliminación de polisacáridos de no almidón (S-NSP) de acuerdo con Bach Knudsen (Bach Knudsen, K. E., Carbohydrate and lignin contents and plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology* 1997, 67, 319-338); DDGS molido (<212 µm) y tampón acetato/CaCl₂ (0,1 M/20 mM, pH 5,0) se añadieron juntos con α-amilasa termoestable (E-BLAAM 53,7 U/mg, Megazyme International) y se incubaron durante 1 h a 100°C con mezcla frecuente. La degradación completa del almidón se realizó mediante incubación con amiloglucosidasa (E-AMGDF 36 U/mg, Megazyme International) durante 2 h a 60°C. Después de eliminar el almidón, se extrajo el S-NSP con un tampón fosfato (0,2 M, pH 7,0) y se colocó a 100°C durante 1 h, seguido de centrifugación. El precipitado se lavó a fondo con tampón fosfato, etanol (85% v/v) y finalmente acetona, con centrifugación y descarte del sobrenadante entre los lavados. La muestra se colocó a temperatura ambiente hasta que esté completamente seca.

Procedimiento

25 Se investigó FveXyn4 solo o en combinación con proteasa en la solubilización de pentosano y proteína de DDGS insolubles preparados. Se pesaron 87,5 mg del sustrato de DDGS insoluble preparado en tubos eppendorf de 1,5 ml y se mezclaron con tampón citrato (25 mM, pH 6), xilanasa (217 mg/kg de sustrato y 206 mg/kg de sustrato para DDGS de maíz y de trigo, respectivamente) y proteasa (8,6 x 10⁵ U/kg de sustrato) hasta un volumen final de reacción de 1,0 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo a 4 h, 39°C y 1300 rpm mediante el uso del incubador Eppendorf ThermoMixer (Eppendorf). Después de la incubación, se filtraron y analizaron las muestras para determinar el contenido de pentosano y proteína solubles como se describe a continuación. Las reacciones se realizaron por duplicado.

Cuantificación de proteína

30 Se cuantificó la proteína soluble usando el kit de ensayo de proteínas BCA (ácido bicíntrico) de Pierce. Las muestras se prepararon en placas de microtitulación (25 µl/pocillo) y se incubaron con 200 µl de reactivo de ensayo premezclado durante 30 minutos a 37°C, 1100 rpm. La absorbancia se midió espectrofotométricamente a 562 nm frente a un estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de 0-2000 µg/ml, como se describe en el manual. Los valores se corrigieron para la cantidad de enzimas añadidas.

35 Cuantificación de azúcares C5 (pentosanos)

40 Se midió la cantidad total de pentosas llevadas a solución usando el método de Rouau y Surget (1994, A rapid semi-automated method of the determination of total and water-extractable pentosan in wheat flours. *Carbohydrate Polymers*, 24, 123-32) con un aparato de inyección de flujo continuo (Figura 7). Los sobrenadantes se trataron con ácido para hidrolizar polisacáridos a monoazúcares. Se añadió Floroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno) para la reacción con monopentosas y monohexosas que forman un complejo coloreado.

Midiendo la diferencia de absorbancia a 550 nm en comparación con 510 nm, se calculó la cantidad de pentosas en la solución usando una curva estándar. A diferencia del complejo de hexosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo hexosa-floroglucinol es constante en esta longitudes de onda. Se añadió glucosa a la solución de floroglucinol para crear una señal de glucosa constante y además asegurar que no haya interferencia de los azúcares de hexosa.

45 Análisis estadístico

Se aplicó ANOVA de una vía en los datos experimentales para la comparación de tratamientos tanto en la solubilización de pentosano como en la proteína, con comparaciones por pares realizadas mediante el método de Holm-Sidak, usando SigmaPlot 12.0 (SyStat Software Inc.). Nivel de significancia general en P = 0,05.

23.2. Resultados y discusión

50 La solubilización de pentosanos y proteínas se midió por incubación de DDGS de maíz y de trigo insolubles con xilanasa y proteasa solas y en combinación.

Los resultados se muestran en la Figura 27 (DDGS de maíz insoluble) y en la Figura 28 (DDGS de trigo insoluble).

La Figura 27 muestra el efecto de los tratamientos con xilanasa y proteasa solos o en combinación sobre la solubilización de pentosano y proteína a partir de DDGS de maíz insoluble. Las letras a-d son significativamente diferentes según las comparaciones de ANOVA y Holm-Sidak con nivel de significancia general con $P = 0,05$. Las barras de error indican S.D.

- 5 La Figura 28 muestra el efecto de los tratamientos de xilanasa y proteasa solos o en combinación en la solubilización de pentosano y proteína a partir de DDGS de trigo insoluble. Las letras a-d son significativamente diferentes de acuerdo con comparaciones de ANOVA de una vía y de Holm-Sidak con nivel de significancia general con $P = 0,05$. Las barras de error indican S.D.

- 10 Cuando se comparó con los efectos del tratamiento con xilanasa por sí mismo, la combinación de xilanasa y proteasa aumentó aún más la solubilización de proteínas de los DDGS tanto de maíz como de trigo. Más interesante aún, la adición de proteasa también aumentó significativamente la solubilización de pentosano de los DDGS tanto de maíz como de trigo lo que indica un efecto sinérgico donde la adición de proteasa aumenta la accesibilidad de la xilanasa hacia el sustrato abriendo la estructura de la matriz del alimento a través de la degradación de proteína. Además, la xilanasa por sí misma y en combinación con la proteasa también aumenta la solubilización de la proteína en comparación con el control y la proteasa sola, respectivamente. Esto apoya aún más la teoría de un efecto sinérgico entre la xilanasa y la proteasa.

Ejemplo 24

Comparación de FveXyn4 y FoxXyn2 en la solubilización de pentosano (ruptura o solubilización de arabinoxilano insoluble (AXinsol))

- 20 Se usó la capacidad de solubilizar el arabinoxilano insoluble a partir de DDGS de maíz como uno de los criterios clave de selección y en este experimento se compara la capacidad de solubilizar arabinoxilano del DDGS de maíz para las dos xilanasas de la presente descripción (FveXyn4 y FoxXyn2).

- 25 Las dos xilanasas mostraron un rendimiento fuerte e igual en la solubilización de pentosano a partir de DDGS de maíz lo que indica un rendimiento igual de estas xilanasas homólogas en la solubilización de arabinoxilano a partir de subproductos fibrosos.

24.1. Materiales y métodos

Muestras de enzima

- 30 Las xilanasas usadas en este estudio son: Una xilanasa GH10 de *Fusarium verticilloides* (designada FveXyn4) expresada en *Trichoderma reesei*, en donde se usó la xilanasa en forma purificada - esta enzima se puede denominar en esta memoria como FveXyn4 y una xilanasa GH10 de *Fusarium oxisporum* (designada FoxXyn2) expresada en *Trichoderma reesei*, en donde se usó la xilanasa en forma purificada - esta enzima se puede denominar en esta memoria como FoxXyn2.

Materias primas de alimento

El alimento usado en estos experimentos es DDGS de maíz.

- 35 Solubilización de pentosano (Solubilización de AXinsol)

El método usado para la solubilización de pentosano fue: se transfirieron 100 mg de materia prima de alimento a un tubo de centrifuga Eppendorf de 2 ml y se registró el peso preciso. Se añadieron 750 μ l de tampón de incubación (HEPES 200 mM, NaCl 100 mM, CaCl 2 mM, pH 6,0) y 900 μ l de solución de cloranfenicol (40 μ g/ml en tampón de incubación). Se añadió la enzima de elección para obtener un volumen total de 1,8 ml.

- 40 Cada muestra se analizó en dobles y en paralelo con un blanco (incubación sin enzima añadida exógenamente). Las muestras se incubaron en un termomezclador Eppendorf a 40°C con agitación. Después de 2 o 18 horas de incubación se filtró el sobrenadante usando placas de filtración de 96 pocillos (Pall Corporation, AcroPrep 96 Filter Plate, Vidrio de 1,0 μ m, NTRL, 1 ml por pocillo). Después de la filtración, las muestras se almacenaron a 4°C hasta el análisis de la cantidad total de azúcares C5, arabinosa y xilosa.

- 45 Cuantificación de azúcares C5 (pentosanos)

- 50 Se midió la cantidad total de pentosas traídas en solución usando el método de Rouau y Surget (1994, A rapid semi-automated method of the determination of total and water-extractable pentosan in wheat flours. Carbohydrate Polymers, 24, 123-32) con un aparato de inyección de flujo continuo (Figura 7). Los sobrenadantes se trataron con ácido para hidrolizar polisacáridos a monoazúcares. Se añadió floroglucinol (1, 3, 5-trihidroxibenceno) para la reacción con monopentosas y monohexosas que forman un complejo coloreado. Midiendo la diferencia de absorbancia a 550 nm en comparación con 510 nm se calculó la cantidad de pentosas en la solución usando una curva estándar. A diferencia del complejo pentosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo hexosa-floroglucinol es constante a estas longitudes

de onda. Se añadió glucosa a la solución de floroglucinol para crear una señal de glucosa constante y además asegurar que no haya interferencia de los azúcares de hexosa.

24.2. Resultados y discusión

5 Se monitorizó la solubilización de pentosano en una configuración de respuesta a la dosis usando un subproducto fibroso de maíz (llamado cDDGS).

Los resultados que comparan las dos xilanasas de la presente descripción (FveXyn4 y FoxXyn2) se muestran en la Figura 29 (en DDGS de maíz).

Las Figuras 29 muestran la solubilización de pentosanos de cDDGS en función de la dosis de xilanasas. Las xilanasas usadas fueron las xilanasas de la presente descripción (FveXyn4 y FoxXyn2).

10 Ambas xilanasas actúan bien sobre maíz y son igualmente buenas para descomponer el AXinsol (p. ej., solubilizando pentosanos) en sustratos a base de maíz lo que indica claramente que estas dos xilanasas homólogas actúan igual en la solubilización de arabinoxilano de subproductos fibrosos.

Listado de secuencias

- <110> DuPont Nutrition Biosciences ApS
- 15 <120> Proteína
- <130> P045404PCT1
- <150> PCT/CN2012/079650
- <151> 03-08-2012
- 20 <150> CN 201310311358.1
- <151> 23-07-2013
- <160> 20
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 328
- 25 <212> PRT
- <213> Fusarium verticillioides
- <400> 1

ES 2 734 145 T3

Met Lys Leu Ser Ser Phe Leu Tyr Thr Ala Ser Leu Val Ala Ala Ile
1 5 10 15

Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu
20 25 30

Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn
35 40 45

Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly
50 55 60

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

Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala
85 90 95

Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser
100 105 110

Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr
115 120 125

Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly
130 135 140

Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly
145 150 155 160

ES 2 734 145 T3

Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp
 165 170 175

Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala
 180 185 190

Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys
 195 200 205

Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly
 210 215 220

Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala
 225 230 235 240

Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val
 245 250 255

Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn
 260 265 270

Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile
 275 280 285

Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu
 290 295 300

His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr
 305 310 315 320

Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 325

<210> 2

<211> 313

<212> PRT

5 <213> *Fusarium verticillioides*

<400> 2

Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys
 1 5 10 15

Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro
 20 25 30

Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe
 35 40 45

ES 2 734 145 T3

Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro
50 55 60

Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe
65 70 75 80

Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His
85 90 95

Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu
100 105 110

Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys
115 120 125

Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp
130 135 140

Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp
145 150 155 160

Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn
165 170 175

Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser
180 185 190

Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln
195 200 205

Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly
210 215 220

Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly
225 230 235 240

Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala
245 250 255

Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys
260 265 270

Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys
275 280 285

Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala

ES 2 734 145 T3

290

295

300

Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
305 310

<210> 3

<211> 305

<212> PRT

5 <213> *Fusarium verticillioides*

<400> 3

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly
50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys
85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
115 120 125

Val Asn Glu Ile Phe Glu Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His
130 135 140

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly

ES 2 734 145 T3

195	200	205
Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala 210 215 220		
Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu 225 230 235 240		
Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys 245 250 255		
Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val 260 265 270		
Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp 275 280 285		
Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Pro Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu 290 295 300		

Arg
305

<210> 4

<211> 1039

<212> ADN

5 <213> Fusarium verticillioides

<400> 4

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc	60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac	120
tacggaacca tcaccgacct caacctgctc ggcgtcgcaa aggacaccgc catcatcaag	180
gccgactttg ggcgcgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc	240
cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgca actttgccca gcagaatggc	300
ctcaaggtcc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg ggtaagaac	360
atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga	420
cgctacaagg gcaagatcta cgctgggta tgttttattc ccccagactt cttcgaaatg	480
actttgctaa catgttcagg acgtcgtcaa cgagatcttc gagtgggacg gtaccctccg	540
aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttccg	600
cgccgcccgc aaggctgacc ccaacgcca gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc	660
cggcagcgcc tccaaggta ccaagggtat ggttccctcc gtcaagaagt ggctcagcca	720
gggcggtccc gtcgacggca ttggctotca gactcacctt gaccccggtg ccgctggcca	780

ES 2 734 145 T3

aatccagggt gctctcactg ccctcgccaa ttctggtgtc aaggaggttg ccatcaccga 840
gctcgacatc cgcactgccc ccgccaacga ctacgctacc gtcaccaagg cctgcctcaa 900
cgtccccaag tgcattggta tcaccgtctg ggggtgtctt gacaagaact cttggcgcaa 960
ggagcacgac agtcttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aagcctgctt aactgctgt 1020
tgtcaacgct ctccgctaa 1039

<210> 5
<211> 987
<212> ADN
5 <213> Fusarium verticillioides

<400> 5
atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc 60
gagccccgcc aggctgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
tacggaacca tcaccgaccc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacaccgc catcatcaag 180
gccgactttg gcgcccgttac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc 240
cagggcaagt tcaacttcgg tagcttcgac caggttgtca actttgcca gcagaatggc 300
ctcaaggtcc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg ggtaagaac 360
atcaacgaca aggtactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccca agtcgttgga 420
cgctacaagg gcaagatcta cgctgggac gtcgtcaacg agatcttoga gtgggacggt 480
accctccgaa aggactctca cttcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt 540
gccttccgcy ccgcccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
ctcgactccg gcagcgcctc caaggtcacc aagggtatgg tccctccgt caagaagtgg 660
ctcagccagg gcggtcccgt cgacggcatt ggctctcaga ctacacttga ccccggtgcc 720
gctggccaaa tccagggtgc tctcactgcc ctcgccaatt ctggtgtcaa ggaggttgcc 780
atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt caccaaggcc 840
tgctcaacg tccccagtg cattggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct 900
tggcgcaagg agcacgacag tcttctgttc gatgctaact acaaccccaa gcctgcttac 960
actgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 6
10 <211> 942
<212> ADN
<213> Fusarium verticillioides

<400> 6
attcccaccg ccatcgagcc ccgccaggct gccgacagca tcaacaagct gatcaagaac 60
aagggcaagc tctactacgg aaccatcacc gaccccaacc tgctcggcgt cgcaaggac 120
accgccatca tcaaggccga ctttggcgcc gttaccccc agaactcggg caagtgggac 180

ES 2 734 145 T3

gccaccgagc ccagccaggg caagttcaac ttcggtagct tcgaccaggt tgtcaacttt 240
 gccccagcaga atggcctcaa ggtccgaggt cacactctgg tctggcactc tcagctccct 300
 cagtggggtta agaacatcaa cgacaaggct actctgacca aggtcattga gaaccacgtc 360
 acccaagtcg ttggacgcta caagggcaag atctacgcct gggacgtcgt caacgagatc 420
 ttcgagtggg acggtaccct ccgaaaggac tctcacttca acaacgtctt cggcaacgac 480
 gactacgttg gcattgcctt ccgcgccgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac 540
 atcaacgact acagcctcga ctccggcagc gcctccaagg tcaccaaggg tatggttccc 600
 tccgtcaaga agtggctcag ccagggcggt cccgctcgac gcattggctc tcagactcac 660
 cttgaccccc gtgccgctgg ccaaatccag ggtgctctca ctgccctcgc caattctggt 720
 gtcaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgactg cccccgcaa cgactacgct 780
 accgtcacca aggctgcct caacgtcccc aagtgcattg gtatcacctg ctgggggtgc 840
 tctgacaaga actcctggcg caaggagcac gacagtcttc tgttcgatgc taactacaac 900
 cccaagcctg cttacactgc tgttgtcaac gctctccgct aa 942

<210> 7
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador 1

<400> 7
 caccatgaag ctgtctctt tctctca 27

10 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador 2

<400> 8
 ttttagcgg agagcgttga caacagc 27

20 <210> 9
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Fusarium oxysporum

<400> 9

Met Lys Leu Ser Ser Phe Leu Tyr Thr Ala Ser Leu Val Ala Ala Ile
 1 5 10 15

ES 2 734 145 T3

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

ES 2 734 145 T3

Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile
 275 280 285

Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu
 290 295 300

His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala Tyr
 305 310 315 320

Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 325

<210> 10

<211> 313

<212> PRT

5 <213> Fusarium oxysporum

<400> 10

Ile Pro Thr Ala Ile Glu Pro Arg Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys
 1 5 10 15

Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro
 20 25 30

Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe
 35 40 45

Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro
 50 55 60

Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe
 65 70 75 80

Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val Arg Gly His Thr Leu Val Trp His
 85 90 95

Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu
 100 105 110

Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys
 115 120 125

Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp
 130 135 140

Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp
 145 150 155 160

ES 2 734 145 T3

Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn
 165 170 175

Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser
 180 185 190

Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln
 195 200 205

Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly
 210 215 220

Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly
 225 230 235 240

Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala
 245 250 255

Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys
 260 265 270

Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys
 275 280 285

Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala
 290 295 300

Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu Arg
 305 310

- <210> 11
- <211> 305
- <212> PRT
- 5 <213> Fusarium oxysporum

<400> 11

Gln Ala Ser Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
 1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
 20 25 30

Thr Ala Ile Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
 35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Lys Phe Asn Phe Gly
 50 55 60

ES 2 734 145 T3

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys
85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Asn Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
115 120 125

Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His
130 135 140

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
165 170 175

Ser Leu Asp Ser Gly Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
195 200 205

Ser Gln Thr His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Ile Gln Gly Ala
210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu
225 230 235 240

Leu Asp Ile Arg Thr Ala Pro Ala Asn Asp Tyr Ala Thr Val Thr Lys
245 250 255

Ala Cys Leu Asn Val Pro Lys Cys Ile Gly Ile Thr Val Trp Gly Val
260 265 270

Ser Asp Lys Asn Ser Trp Arg Lys Glu His Asp Ser Leu Leu Phe Asp
275 280 285

Ala Asn Tyr Asn Pro Lys Ala Ala Tyr Thr Ala Val Val Asn Ala Leu
290 295 300

Arg
305

ES 2 734 145 T3

<210> 12
 <211> 1039
 <212> ADN
 <213> Fusarium oxysporum

5 <400> 12

```

atgaagctgt cttccttct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc      60
gagccccgcc aggctccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac      120
tacggaacca tcaccgacct caacctgctc ggcgtcgcaa aggacactgc catcatcaag      180
gctgactttg ggcgctcac acccgagaac tcgggtaagt gggatgccac cgagcccagc      240
cagggcaagt tcaacttcgg cagcttcgac caggctgctc actttgctca gcagaatggc      300
ctcaaggtcc gaggtcacac tctagtctgg cactcccagc tccctcagtg ggtaagaac      360
atcaacgaca aggctacttt gaccaaggtc atcgagaacc acgtcaccaa cgtcgttgga      420
cgctacaagg gcaagatcta cgctgggta tgttttcttc actcgaactt cttataaatg      480
gctttactaa catgttcagg acgtcgtaa cgagatcttc gactgggatg gtaccctccg      540
aaaggactct cacttcaaca acgtcttcgg caacgacgac tacgttggca ttgccttccg      600
cgctgcccgc aaggctgacc ccaacgcaa gctgtacatc aacgactaca gcctcgactc      660
cggcagcgcc tccaagggtca ccaagggcat ggttccctct gtcaagaagt ggctcagcca      720
gggctcccc gtgcagggta ttggttctca gactcacctt gaccccggtg ccgctggcca      780
aatccagggt gctctcactg ccctcgcaa ctctggtgtg aaggaggttg ccatcaccga      840
gctcgacatc cgcactgccc ccgccaacga ctacgctacc gttaccaagg cctgcctcaa      900
cgtccccaaag tgcattggta tcaccgtctg gggcgtatct gacaagaact cttggcgcaa      960
ggagcacgac agccttctgt tcgatgctaa ctacaacccc aaggctgctt aactgctgt      1020
tgtcaacgct ctccgctaa                                     1039
    
```

<210> 13
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> Fusarium oxysporum

10 <400> 13

```

atgaagctgt cttccttct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc      60
gagccccgcc aggctccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac      120
tacggaacca tcaccgacct caacctgctc ggcgtcgcaa aggacactgc catcatcaag      180
gctgactttg ggcgctcac acccgagaac tcgggtaagt gggatgccac cgagcccagc      240
cagggcaagt tcaacttcgg cagcttcgac caggctgctc actttgctca gcagaatggc      300
ctcaaggtcc gaggtcacac tctagtctgg cactcccagc tccctcagtg ggtaagaac      360
    
```

ES 2 734 145 T3

atcaacgaca aggctacttt gaccaaggtc atcgagaacc acgtcaccaa cgtcgttgga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggac gtcgtaaacg agatcttcga ctgggatggg 480
 accctccgaa aggactctca cttcaacaac gtcttcggca acgacgacta cgttggcatt 540
 gccttccgcg ctgcccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
 ctcgactccg gcagcgcctc caaggtcacc aagggcatgg ttccctctgt caagaagtgg 660
 ctcagccagg gcgtccccgt cgacggtatt ggttctcaga ctcaccttga ccccggtgcc 720
 gctggccaaa tccagggtgc tctcactgcc ctgcgcaact ctggtgtgaa ggaggttgcc 780
 atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgctaccgt taccaaggcc 840
 tgctcaacg tccccaaagtg cattggtatc accgtctggg gcgtatctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcacgacag ccttctgttc gatgctaact acaaccccaa ggctgcttac 960
 actgctggtg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 14
 <211> 942
 <212> ADN

5 <213> Fusarium oxysporum

<400> 14

attcccaccg ccatcgagcc ccgccaggcc tccgacagca tcaacaagct gatcaagaac 60
 aagggcaagc tctactacgg aaccatcacc gacccaacc tgctcggcgt cgcaaaggac 120
 actgccatca tcaaggctga ctttggcgcc gtcacaccg agaactcggg taagtgggat 180
 gccaccgagc ccagccaggg caagttcaac ttcggcagct tcgaccaggc cgtcaacttt 240
 gctcagcaga atggcctcaa ggtccgaggt cacactctag tctggcactc ccagctccct 300
 cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actttgacca aggtcatcga gaaccacgtc 360
 accaacgtcg ttggacgcta caagggcaag atctacgcct gggacgtcgt taacgagatc 420
 ttcgactggg atggtaccct ccgaaaggac tctcacttca acaacgtctt cggcaacgac 480
 gactacgttg gcattgcctt ccgcgctgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac 540
 atcaacgact acagcctcga ctccggcagc gcctccaagg tcaccaaggg catggttccc 600
 tctgtcaaga agtggctcag ccagggcgtc cccgtcgacg gtattggttc tcagactcac 660
 cttgaccccg gtgocgctgg ccaaatccag ggtgctctca ctgccctcgc caactctggt 720
 gtgaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgcaactg cccccgcaa cgactacgct 780
 accgttacca aggctgcct caacgtcccc aagtgcattg gtatcacctg ctggggcgta 840
 tctgacaaga actcttggcg caaggagcac gacagccttc tgttcgatgc taactacaac 900
 cccaaggctg cttacactgc tgttgtcaac gctctccgct aa 942

<210> 15
 <211> 305
 <212> PRT

10

ES 2 734 145 T3

<213> Fusarium sp.

<400> 15

Gln Ala Ala Asp Ser Ile Asn Lys Leu Ile Lys Asn Lys Gly Lys Leu
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Thr Ile Thr Asp Pro Asn Leu Leu Gly Val Ala Lys Asp
20 25 30

Thr Ala Val Ile Lys Ala Asp Phe Gly Ala Val Thr Pro Glu Asn Ser
35 40 45

Gly Lys Trp Asp Ala Thr Glu Pro Ser Gln Gly Asn Phe Asn Phe Gly
50 55 60

Ser Phe Asp Gln Val Val Asn Phe Ala Gln Gln Asn Gly Leu Lys Val
65 70 75 80

Arg Gly His Thr Leu Val Trp His Ser Gln Leu Pro Gln Trp Val Lys
85 90 95

Asn Ile Asn Asp Lys Ala Thr Leu Thr Lys Val Ile Glu Asn His Val
100 105 110

Thr Gln Val Val Gly Arg Tyr Lys Gly Lys Ile Tyr Ala Trp Asp Val
115 120 125

Val Asn Glu Ile Phe Asp Trp Asp Gly Thr Leu Arg Lys Asp Ser His
130 135 140

Phe Asn Asn Val Phe Gly Asn Asp Asp Tyr Val Gly Ile Ala Phe Arg
145 150 155 160

Ala Ala Arg Lys Ala Asp Pro Asn Ala Lys Leu Tyr Ile Asn Asp Tyr
165 170 175

Ser Leu Asp Ser Ala Ser Ala Ser Lys Val Thr Lys Gly Met Val Pro
180 185 190

Ser Val Lys Lys Trp Leu Ser Gln Gly Val Pro Val Asp Gly Ile Gly
195 200 205

Ser Gln Ser His Leu Asp Pro Gly Ala Ala Gly Gln Val Gln Gly Ala
210 215 220

Leu Thr Ala Leu Ala Asn Ser Gly Val Lys Glu Val Ala Ile Thr Glu

ES 2 734 145 T3

<210> 17
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> Fusarium sp.

5 <400> 17

atgaagctgt cttctttcct ctacaccgcc tcgctggtcg cggccattcc caccgccatc 60
 gagccccgcc aggccgccga cagcatcaac aagctgatca agaacaaggg caagctctac 120
 tacggaacca tcaccgacc caacctgctc ggcgtcgcaa aggacaccgc cgtcatcaag 180
 gccgactttg gcgccgtcac ccccgagaac tcgggcaagt gggacgccac cgagcccagc 240
 cagggcaact tcaacttcgg tagcttcgac caggctctca actttgctca gcagaatggc 300
 ctcaaggtcc gaggtcacac tctggtctgg cactctcagc tccctcagtg ggtaagaac 360
 atcaacgaca aggctactct gaccaaggtc attgagaacc acgtcaccga agtcggttga 420
 cgctacaagg gcaagatcta cgcctgggac gttgtcaacg agatcttga ctgggacggt 480
 accctccgaa aggatttcta cttcaacaac gtcttcggca acgatgacta cgttggcatt 540
 gccttcogcg ccgcccgcaa ggctgacccc aacgccaagc tgtacatcaa cgactacagc 600
 ctogactccg ccagcgcctc caaggtcacc aagggcatgg tcccctccgt caagaagtgg 660
 ctacgccagg gcgttcccgt cgacggcatt ggctcccagt ctcaccttga ccccggtgcc 720
 gctggccaag tccaggtgct tctcactgcc ctcgccaact ctggtgtcaa ggaggttgcc 780
 atcaccgagc tcgacatccg cactgcccc gccaacgact acgccaccgt caccaaggcc 840
 tgctaaacg tccccagt cttggtatc accgtctggg gtgtctctga caagaactct 900
 tggcgcaagg agcacgacag cttctgttc gactccaact acaaccccaa gcctgcttac 960
 actgctgttg tcaacgctct ccgctaa 987

<210> 18
 <211> 942
 <212> ADN
 <213> Fusarium sp.

10

<400> 18

attcccaccg ccatcgagcc ccgccaggcc gccgacagca tcaacaagct gatcaagaac 60
 aagggcaagc tctactacgg aaccatcacc gacccaacc tgctcggcgt cgcaaaggac 120
 accgcccgtca tcaaggccga ctttggcgcc gtcaccccc agaactcggg caagtgggac 180
 gccaccgagc ccagccaggg caacttcaac ttcggtagct tcgaccaggc cgtcaacttt 240
 gctcagcaga atggcctcaa ggtccgaggc cacactctgg tctggcactc tcagctccct 300
 cagtgggtta agaacatcaa cgacaaggct actctgacca aggtcattga gaaccacgctc 360
 acccaagtcg ttggacgcta caagggcaag atctacgcct gggacgttgt caacgagatc 420

ES 2 734 145 T3

ttcgactggg acggtaccct ccgaaaggat tctcacttca acaacgtctt cggcaacgat 480
gactacgttg gcattgcctt ccgcgccgcc cgcaaggctg accccaacgc caagctgtac 540
atcaacgact acagcctcga ctccgccagc gcctccaagg tcaccaaggg catggtcccc 600
tccgtcaaga agtggctcag ccagggcggt cccgtcgacg gcattggctc ccagtctcac 660
cttgaccccc gtgccgctgg ccaagtccag ggtgctctca ctgccctcgc caactctggt 720
gtcaaggagg ttgccatcac cgagctcgac atccgcaactg cccccgcaa cgactacgcc 780
accgtcacca aggcctgcct aaacgtcccc aagtgcattg gtatcacctg ctgggggtgc 840
tctgacaaga actcttggcg caaggagcac gacagccttc tgttcgactc caactacaac 900
cccaagcctg cttacactgc tgttgtcaac gctctccgct aa 942

<210> 19

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 1

<400> 19

ccgcgccgc accatgaagc tgtcttcctt cctctacacc 40

10 <210> 20

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cebador 2

<400> 20

ccggcgccc ctattagcg gagagcgttg acaacag 37

REIVINDICACIONES

1. Un método para degradar material que contiene arabinoxilano insoluble en un material que contiene xilano, que comprende mezclar dicho material que contiene xilano con una xilanasa que comprende una secuencia polipeptídica que se muestra en esta memoria como SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 1; o una variante u homólogo de esta que tenga al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 3 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N° 3, la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1 con una sustitución conservativa de al menos uno o de al menos 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 4, o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 6 o la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4 debido a la degeneración del código genético.
2. El uso de una xilanasa que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 1; o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 3 o la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N° 3, la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 4 o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N° 6, la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4 debido a la degeneración del código genético para solubilizar arabinoxilano en un material que contiene xilano.
3. El método o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 en donde el material que contiene xilano se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: un alimento o un pienso; un componente alimentario; un material a base de grano; una papilla; un mosto; una malta; apenas malteada; un complemento; una papilla apenas y una harina de cereal.
4. El método o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde se solubilizan los arabinoxilanos sin aumentar la viscosidad en el medio de reacción.
5. El método o uso de acuerdo con la reivindicación 3 en donde el alimento o el pienso o el componente alimentario comprende o consiste en maíz, DDGS, trigo, salvado de trigo o una combinación de estos.
6. El método o uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la xilanasa se usa en combinación con una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serín proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una amilasa (que incluye α -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y γ -amilasas (E.C. 3.2.1.3) y/o una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serín proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)).
7. Un polipéptido que tiene actividad xilanasa que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 1 o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 99% de identidad con la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1; o un polipéptido que está codificado por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N° 5 o SEQ ID N° 4 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% de identidad con la SEQ ID N° 5 o la SEQ ID N° 4.
8. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 7 en donde:
- a) el polipéptido es una endo-1,4- β -xilanasa; y/o
 - b) el polipéptido tiene una temperatura óptima en el intervalo de 50-70°C, preferiblemente aproximadamente 60°C; y/o
 - c) el polipéptido tiene un pH óptimo en el intervalo de 4,6 a 7, preferiblemente aproximadamente 6; y/o
 - d) el polipéptido se formula con un recubrimiento o está encapsulado.
9. Una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una secuencia de polinucleótidos que codifica una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID N° 2 o la SEQ ID N° 1 o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 99% de identidad con SEQ ID N° 2 o SEQ ID N° 1; o

b) una secuencia de polinucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4; o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 97,7% de identidad (preferiblemente un 98% de identidad) con la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4.

- 5 10. Una composición de aditivo alimentario o una premezcla que comprende (o que consiste esencialmente en o que consiste en) una xilanasa que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 3, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1; o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N°. 3 o la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1; o una secuencia polipeptídica que comprende SEQ ID N°. 3, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 6, SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N°. 6, la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N°. 6, la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N°. 6 o la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4 debido a la degeneración del código genético o un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, y opcionalmente al menos un mineral y/o al menos una vitamina.
- 10 11. La composición de aditivo alimentario o premezcla de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende además una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (p. ej., subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serín proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una amilasa (que incluye α -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60), β -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y γ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)).
- 15 12. Un método para preparar un pienso que comprende mezclar un componente alimentario con una xilanasa que comprende una secuencia polipeptídica mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 3, SEQ ID N°. 2 o SEQ ID N°. 1; o una variante u homólogo de esta que tiene al menos un 75% de identidad con la SEQ ID N°. 3 o la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1; o una secuencia polipeptídica que comprende la SEQ ID N°. 3, la SEQ ID N°. 2 o la SEQ ID N°. 1 con una sustitución conservativa de al menos uno y menos de 15 de los aminoácidos; o una xilanasa que está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en esta memoria como SEQ ID N°. 6, SEQ ID N°. 5 o SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que puede hibridar con la SEQ ID N°. 6, la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4 en condiciones de alta astringencia, o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID N°. 6, la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4, o una secuencia de nucleótidos que difiere de la SEQ ID N°. 6 o la SEQ ID N°. 5 o la SEQ ID N°. 4 debido a la degeneración del código genético; o un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, o una composición de aditivo alimentario de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11.
- 20 13. Un pienso que comprende una composición de aditivo alimentario o premezcla de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 obtenidas mediante el método de la reivindicación 12.
- 25 14. El uso de una composición de aditivo alimentario o premezcla de acuerdo con la reivindicación 10 en alimentación o un pienso de acuerdo con la reivindicación 13, para mejorar el rendimiento del animal que incluye aumentar la eficacia del alimento y/o aumentar la ganancia de peso y/o reducir la relación de conversión del alimento y/o mejorar la digestibilidad de los nutrientes o la energía en un alimento y/o mejorar la retención de nitrógeno y/o mejorar la respuesta inmune en el sujeto que se produce con el uso de la composición de aditivo alimentario de la presente invención en alimentos en comparación con alimentos que no comprenden dicha composición de aditivo alimentario.
- 30 35 40

FIGURA 1

(SEQ ID N° 1)

mklssfiytaslvaa***IPTAIEPRQAADSINKLIKNKGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN***
SGKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK
VIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADP
NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN
YNPKPAYTAVVNALR

FIGURA 2

(SEQ ID N° 2)

IPTAIEPRQAADSINKLIKNKGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP
SQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVV
GRYKGKIYAWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDYS
LDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAI
TELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNP
KPAYTAVVNALR

FIGURA 3

(SEQ ID N° 3)

QAADSINKLIKNKGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFN
GSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIY
AWDVVNEIFEWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASK
VTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAITELDIRTAP
ANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNP
KPAYTAVVNALR

FIGURA 4

(SEQ ID N° 4)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAGCTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCC
AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA
GTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA
CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGgtatgtttattccccagacttctt
cgaaatgactttgctaacatgttcagGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCC
GAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTC
CGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCG
ACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCTCCGTCAAGAAGTGGCT
CAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC
GCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTG
CCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAA
GGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAG
AACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCC
TGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 5

(SEQ ID N° 5)

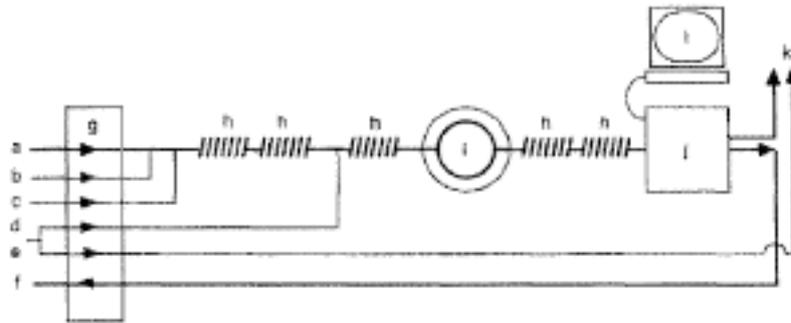
**ATGAAGCTGTCTTCTTTCTTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCGAGAAGTCTGGGCAAGTGGGACGCCACC
GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCC
AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA
GTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA
CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGAT
CTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAAC
GACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGC
TGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTAT
GGTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCTCGTACGCGCATTGGCTCT
CAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCG
CCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGC
CAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCA
CCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTT
CGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA**

FIGURA 6

(SEQ ID N° 6)

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGA
ACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAA
GGACACCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAGCTCGGGCAAG
TGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTG
TCAACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCT
CAGCTCCCTCAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGA
GAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTC
GTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGT
CTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCC
AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCA
CCAAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGG
CATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTC
ACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCA
CTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTG
CATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGAC
AGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCT
CTCCGCTAA

FIGURA 7



Salvado de trigo

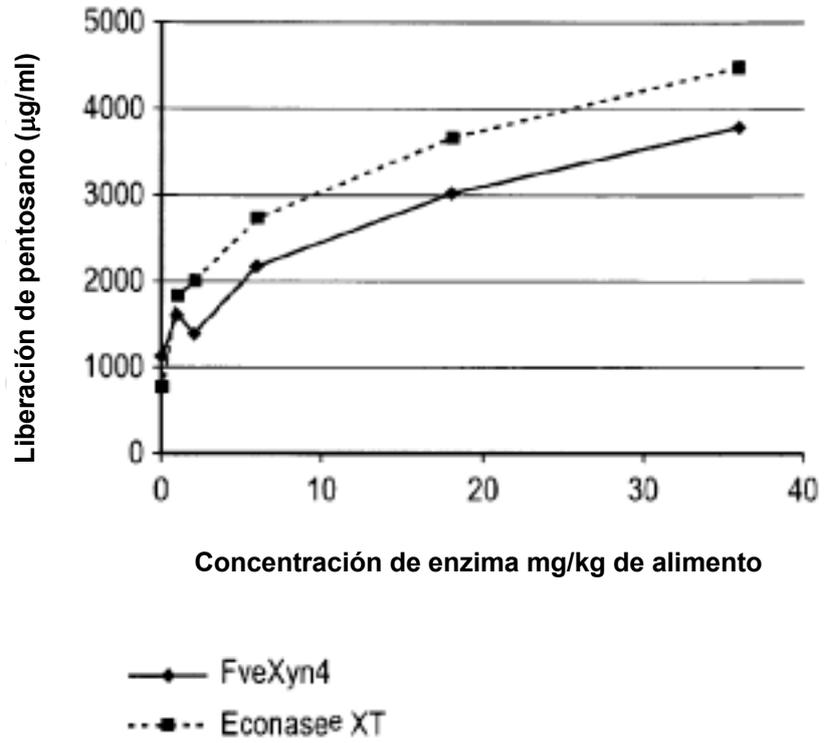


FIG. 8

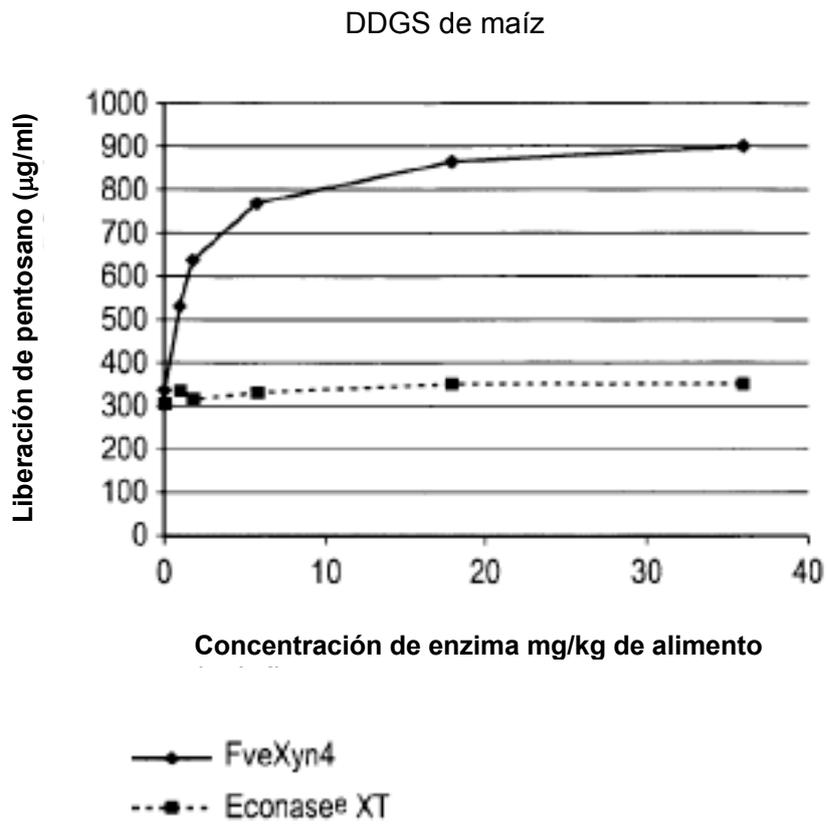


FIG. 9

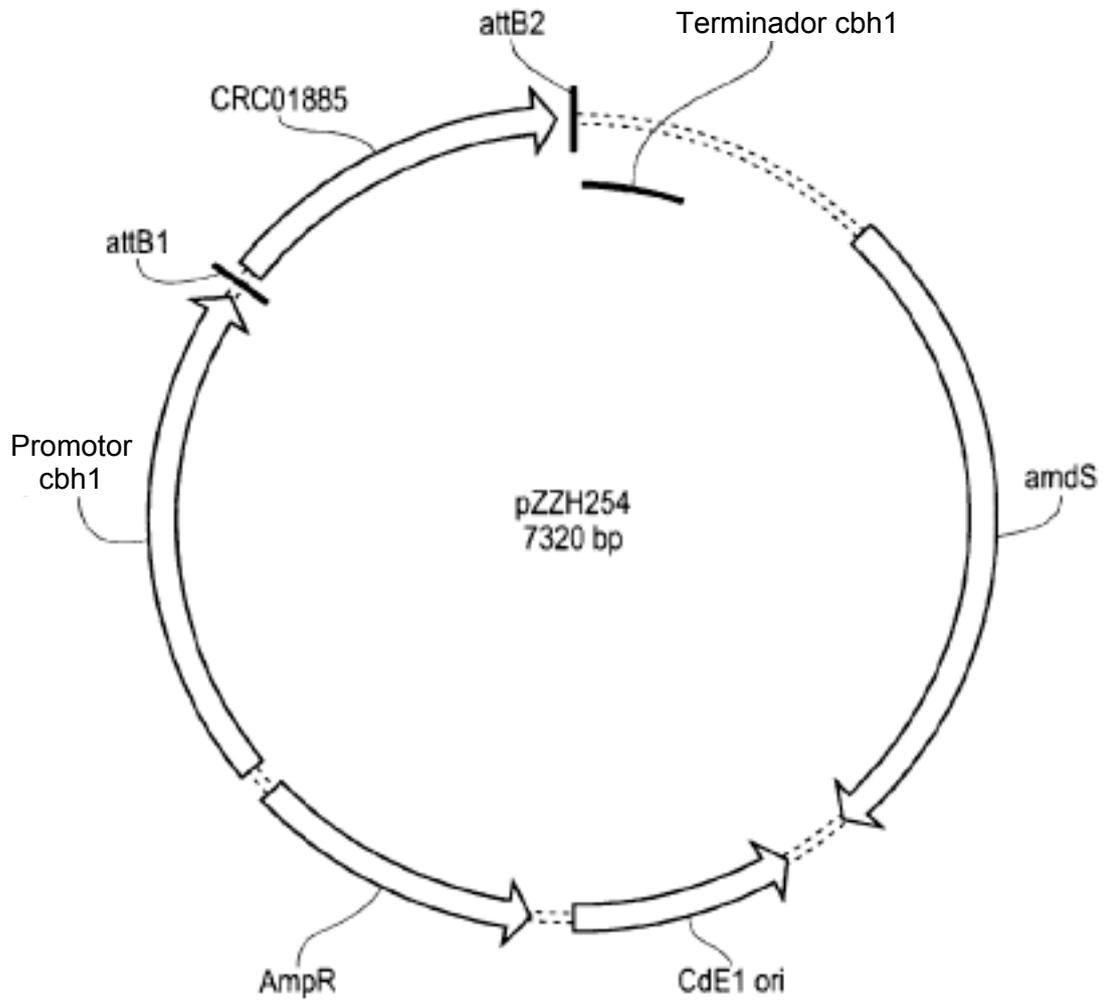


FIG. 10

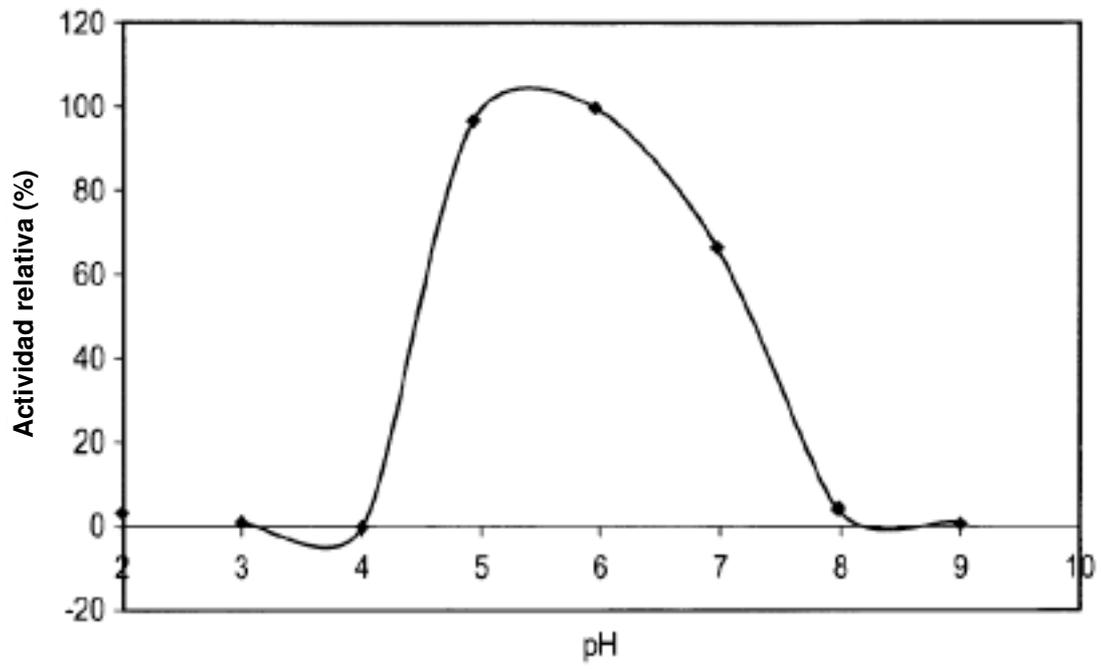


FIG. 11

FIGURA 12

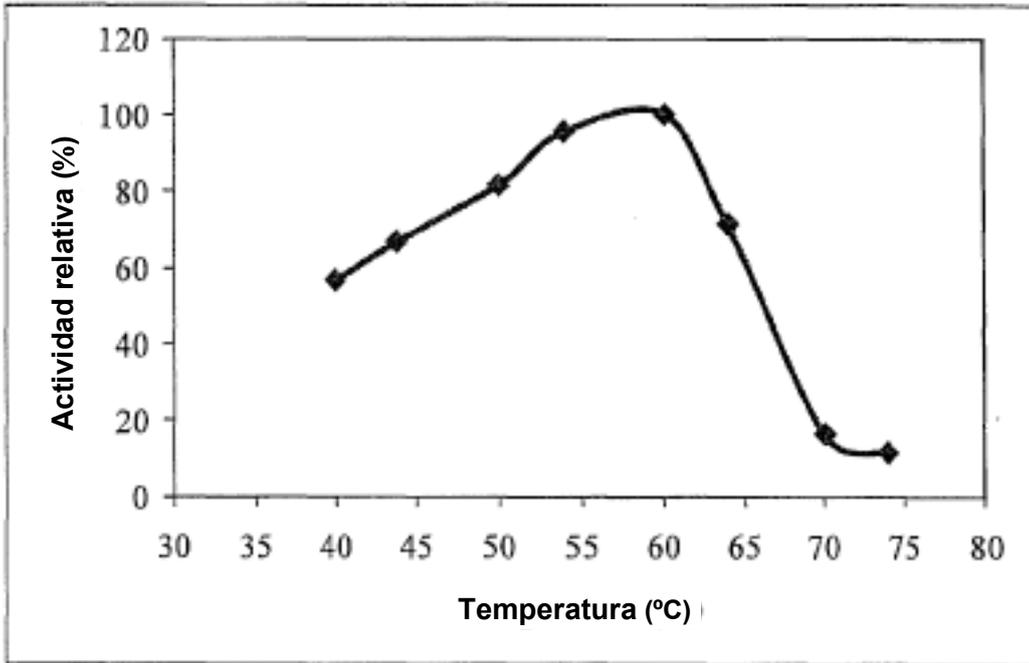


FIGURA 13

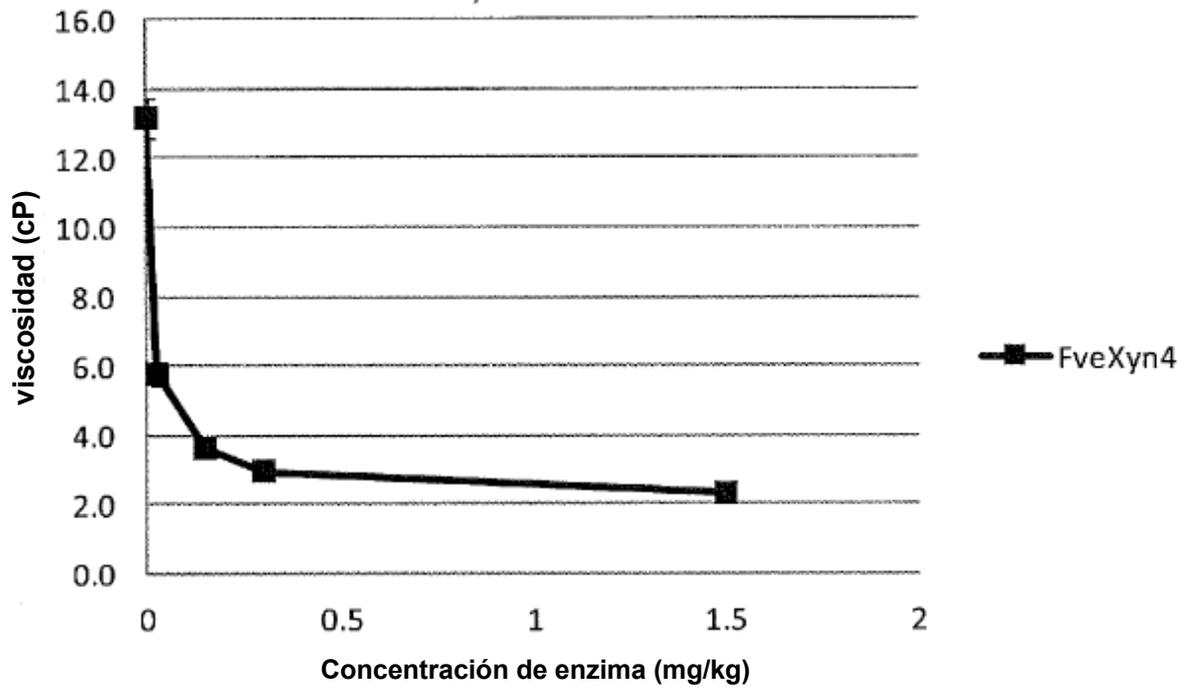


FIGURA 14

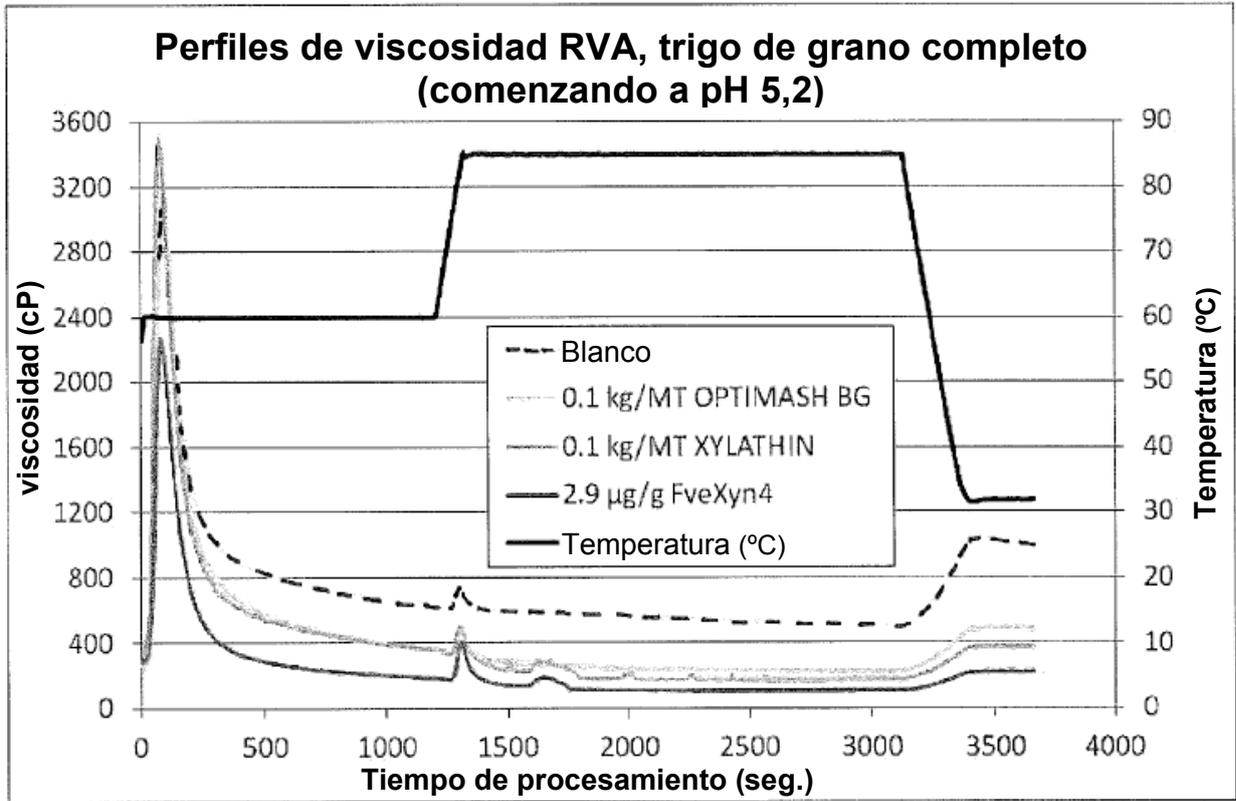


FIGURA 15

(SEQ ID N°. 9)

mklsstiytaslvaa*IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN*
SGKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLWHSQLPQWVKNINDKATLTK
VIENHVTNVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADP
NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN
YNPKAAYTAVVNALR

FIGURA 16

(SEQ ID N°.10)

IPTAIEPRQASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP
SQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTNV
GRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDY
LDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAI
TELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAV
VNALR

FIGURA 17

(SEQ ID N°. 11)

QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFN
GSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTNVVGRYKGKIY
AWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASK
VTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAITELDIRTAP
ANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAVVNALR

FIGURA 18

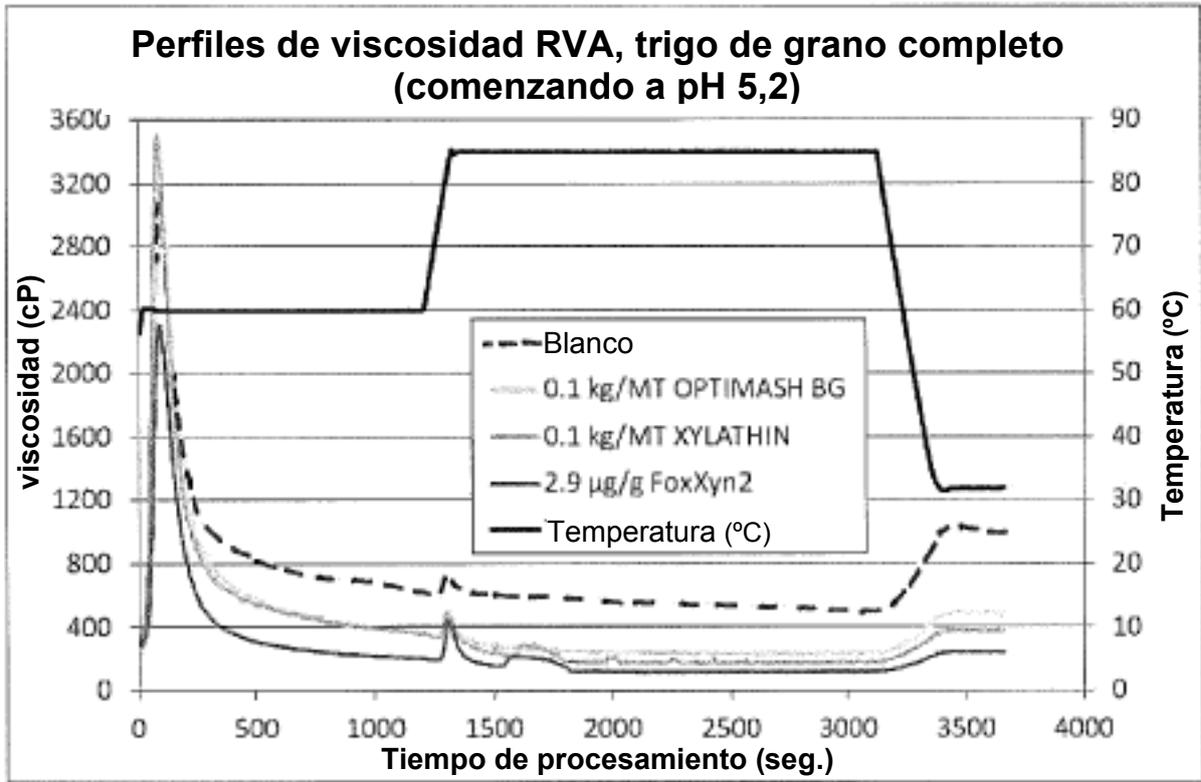


FIGURA 19

SEQ ID N° 12

ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC
ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG
AGCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAG
TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCAC
CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG*gtatgtttcttactcgaacttctataaa*
*tgctttactaacatgttcag***GACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAG**
GACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGC
TGCCC GCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCC
GGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCC
AGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGG
CAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACCTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATC
ACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCT
GCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCT
TGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTA
CACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 20**SEQ ID N° 13**

**ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC
ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG
AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAG
TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCAC
CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTTAACGAGATC
TTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGA
CGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG
TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG
TTCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCA
GACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC
AACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCA
ACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACC
GTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCG
ATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA**

FIGURA 21**SEQ ID N° 14**

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGA
ACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAA
GGACACTGCCATCATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAAGCTCGGGTAAG
TGGGATGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCG
TCAACTTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCC
CAGCTCCCTCAGTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGA
GAACCACGTCACCAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTC
GTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGT
CTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCCGCAAGGCTGACCCC
AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCA
CCAAGGGCATGGTTCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTGACG
GTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCT
CACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGC
ACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGT
GCATTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAAGTCTTGGCGCAAGGAGCACGA
CAGCCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACG
CTCTCCGCTAA

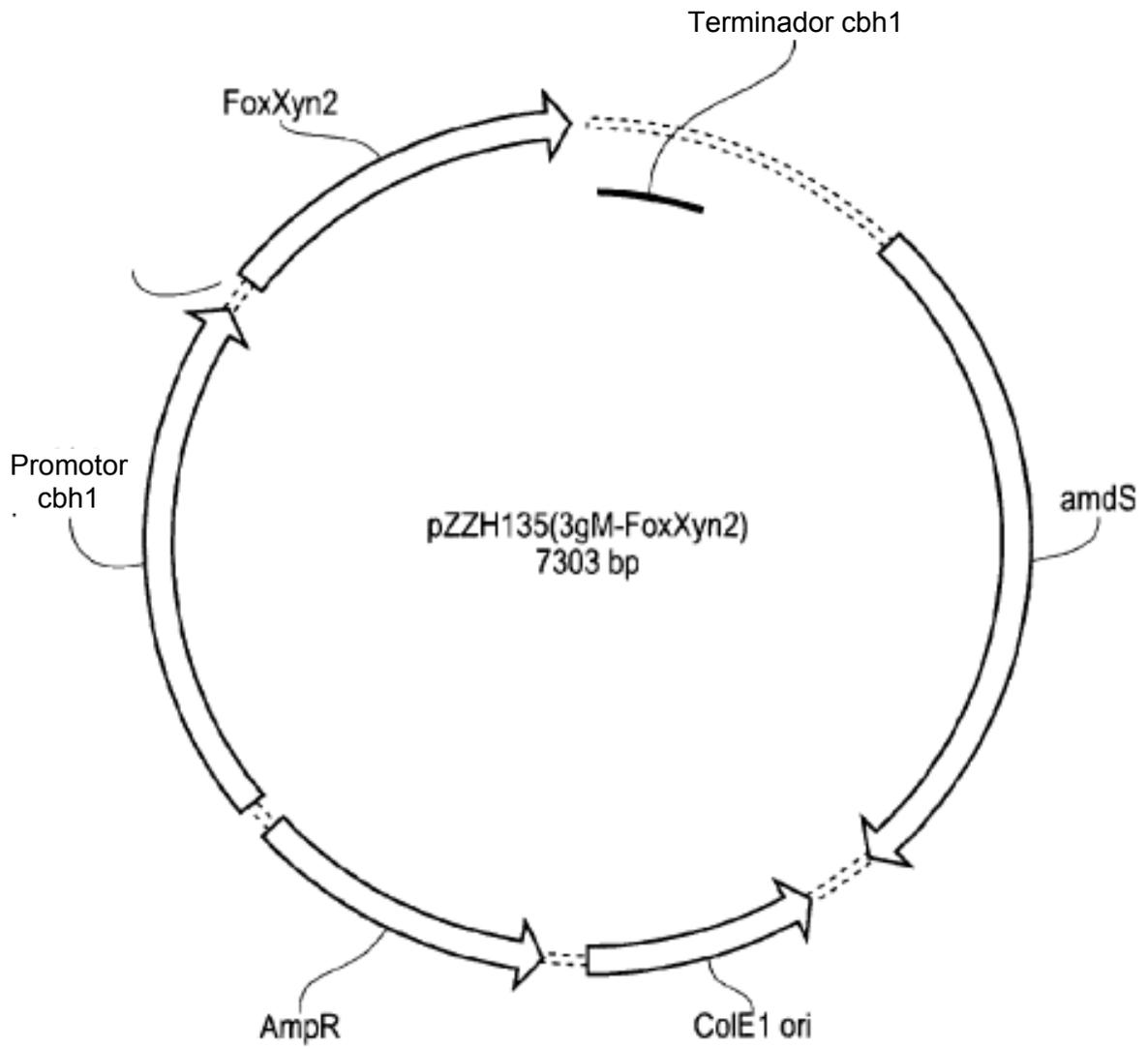


FIG. 22

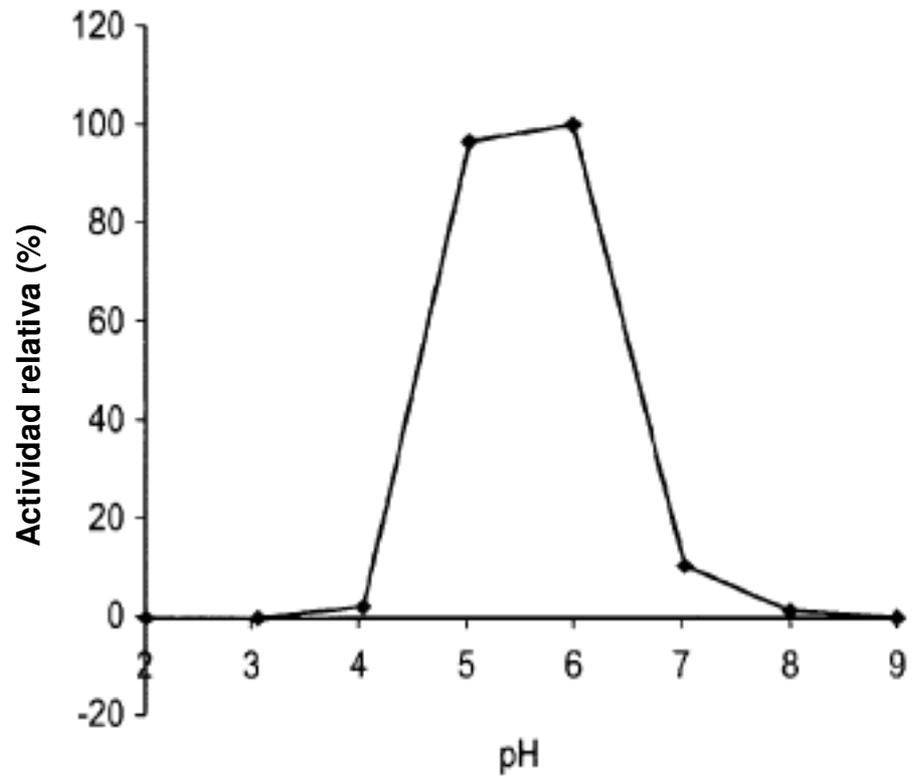


FIG. 23

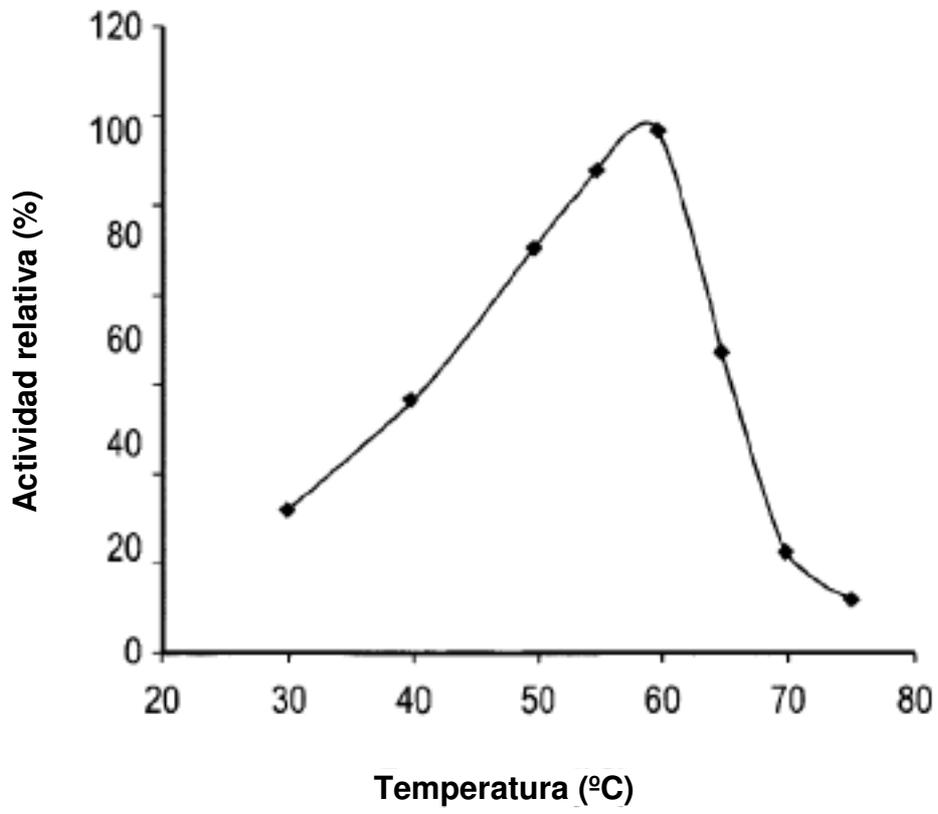


FIG. 24

FIGURA 25

SEQ ID N° 15

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAVIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGNFN
FGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKI
YAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGI AFRAARKADPNAKLYINDYSLDSASAS
KVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQSHLDPGAAGQVQGALTALANSGVKEVAITELDIRT
APANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDSNYNPKPAYTAVNALR

SEQ_ID No.3	QIA	D	S	I	N	K	L	I	K	N	K	G	K	L	Y	Y	G	T	I	T	D	P	N	L	L	G	V	A	K	D	T	A	I	I	K	A	D	F	G	A	V	T	P	E	N	S	G	K	W	D	A	T	E	55				
SEQ_ID No.11	QIA	S	D	S	I	N	K	L	I	K	N	K	G	K	L	Y	Y	G	T	I	T	D	P	N	L	L	G	V	A	K	D	T	A	I	I	K	A	D	F	G	A	V	T	P	E	N	S	G	K	W	D	A	T	E	55			
SEQ_ID No.15	QIA	A	D	S	I	N	K	L	I	K	N	K	G	K	L	Y	Y	G	T	I	T	D	P	N	L	L	G	V	A	K	D	T	A	V	I	K	A	D	F	G	A	V	T	P	E	N	S	G	K	W	D	A	T	E	55			
SEQ_ID No.3	PIS	Q	G	K	F	N	F	G	S	F	D	Q	V	V	N	F	A	Q	N	G	L	K	V	R	I	G	H	T	L	V	W	H	S	Q	L	P	I	Q	W	V	K	N	I	N	D	K	A	T	L	T	K	V	I	E	N	110		
SEQ_ID No.11	PIS	Q	G	K	F	N	F	G	S	F	D	Q	V	V	N	F	A	Q	N	G	L	K	V	R	I	G	H	T	L	V	W	H	S	Q	L	P	I	Q	W	V	K	N	I	N	D	K	A	T	L	T	K	V	I	E	N	110		
SEQ_ID No.15	PIS	Q	G	N	F	N	F	G	S	F	D	Q	V	V	N	F	A	Q	N	G	L	K	V	R	I	G	H	T	L	V	W	H	S	Q	L	P	I	Q	W	V	K	N	I	N	D	K	A	T	L	T	K	V	I	E	N	110		
SEQ_ID No.3	HVT	I	Q	V	V	G	R	Y	K	G	K	I	Y	A	W	D	V	V	N	E	I	F	E	W	D	I	G	I	T	L	R	K	D	S	H	F	N	N	V	F	G	N	D	D	Y	V	G	I	A	F	R	A	A	R	K	A	165	
SEQ_ID No.11	HVT	N	V	V	G	R	Y	K	G	K	I	Y	A	W	D	V	V	N	E	I	F	D	W	D	G	T	L	R	K	D	S	H	F	N	N	V	F	G	N	D	D	Y	V	G	I	A	F	R	A	A	R	K	A	165				
SEQ_ID No.15	HVT	Q	V	V	G	R	Y	K	G	K	I	Y	A	W	D	V	V	N	E	I	F	D	W	D	G	T	L	R	K	D	S	H	F	N	N	V	F	G	N	D	D	Y	V	G	I	A	F	R	A	A	R	K	A	165				
SEQ_ID No.3	DIP	N	A	K	L	Y	I	N	D	Y	S	L	I	D	S	G	I	S	A	S	K	I	V	T	K	G	M	V	P	S	V	K	K	W	L	S	Q	G	V	P	V	D	G	I	G	S	Q	T	H	L	D	P	G	A	A	G	Q	220
SEQ_ID No.11	DIP	N	A	K	L	Y	I	N	D	Y	S	L	I	D	S	G	I	S	A	S	K	I	V	T	K	G	M	V	P	S	V	K	K	W	L	S	Q	G	V	P	V	D	G	I	G	S	Q	T	H	L	D	P	G	A	A	G	Q	220
SEQ_ID No.15	DIP	N	A	K	L	Y	I	N	D	Y	S	L	I	D	S	A	S	A	S	K	I	V	T	K	G	M	V	P	S	V	K	K	W	L	S	Q	G	V	P	V	D	G	I	G	S	Q	S	H	L	D	P	G	A	A	G	Q	220	
SEQ_ID No.3	I	Q	G	A	L	T	A	L	A	N	S	I	G	V	K	E	V	A	I	T	E	L	D	I	R	T	A	P	A	N	D	Y	A	T	V	T	K	A	C	L	N	V	P	K	C	I	G	I	T	V	W	G	V	S	D	K	275	
SEQ_ID No.11	I	Q	G	A	L	T	A	L	A	N	S	I	G	V	K	E	V	A	I	T	E	L	D	I	R	T	A	P	A	N	D	Y	A	T	V	T	K	A	C	L	N	V	P	K	C	I	G	I	T	V	W	G	V	S	D	K	275	
SEQ_ID No.15	V	I	Q	G	A	L	T	A	L	A	N	S	I	G	V	K	E	V	A	I	T	E	L	D	I	R	T	A	P	A	N	D	Y	A	T	V	T	K	A	C	L	N	V	P	K	C	I	G	I	T	V	W	G	V	S	D	K	275
SEQ_ID No.3	N	I	S	W	R	K	E	H	I	S	L	I	F	D	A	N	Y	N	P	K	P	A	Y	T	A	V	V	N	A	L	R	305																										
SEQ_ID No.11	N	I	S	W	R	K	E	H	I	S	L	I	F	D	A	N	Y	N	P	K	P	A	Y	T	A	V	V	N	A	L	R	305																										
SEQ_ID No.15	N	I	S	W	R	K	E	H	I	S	L	I	F	D	S	N	Y	N	P	K	P	A	Y	T	A	V	V	N	A	L	R	305																										

FIG. 26

FIGURA 27

Maíz en DDGS:

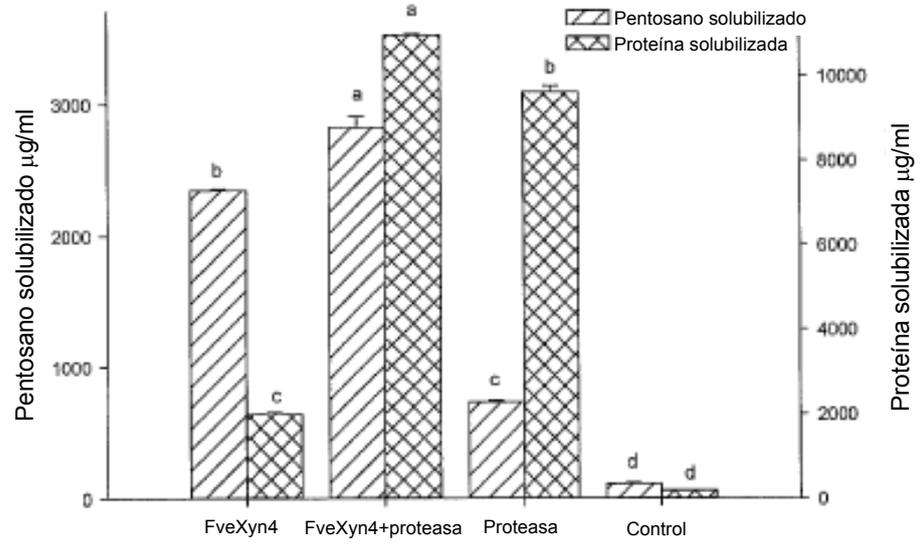
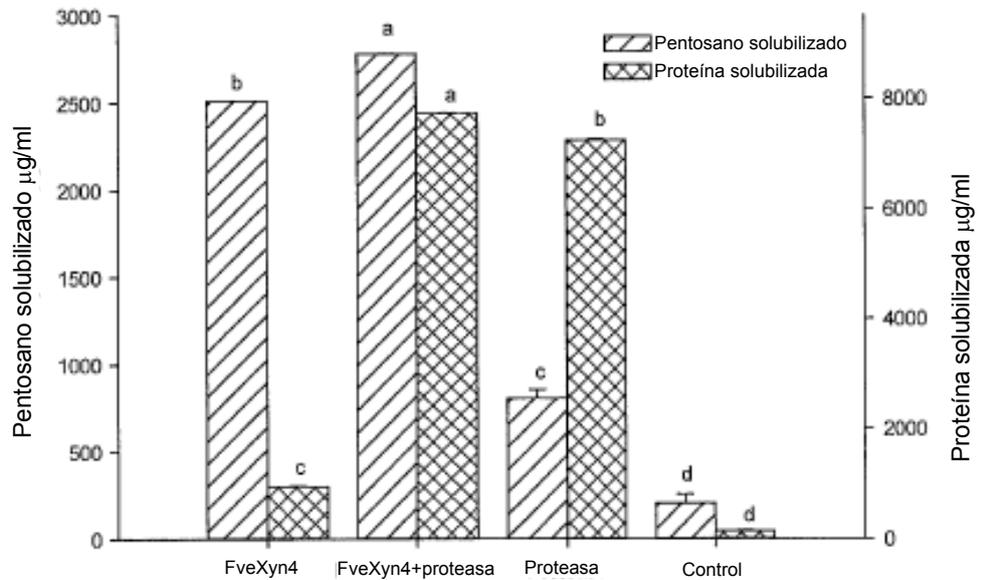


FIGURA 28

Trigo en DDGS:



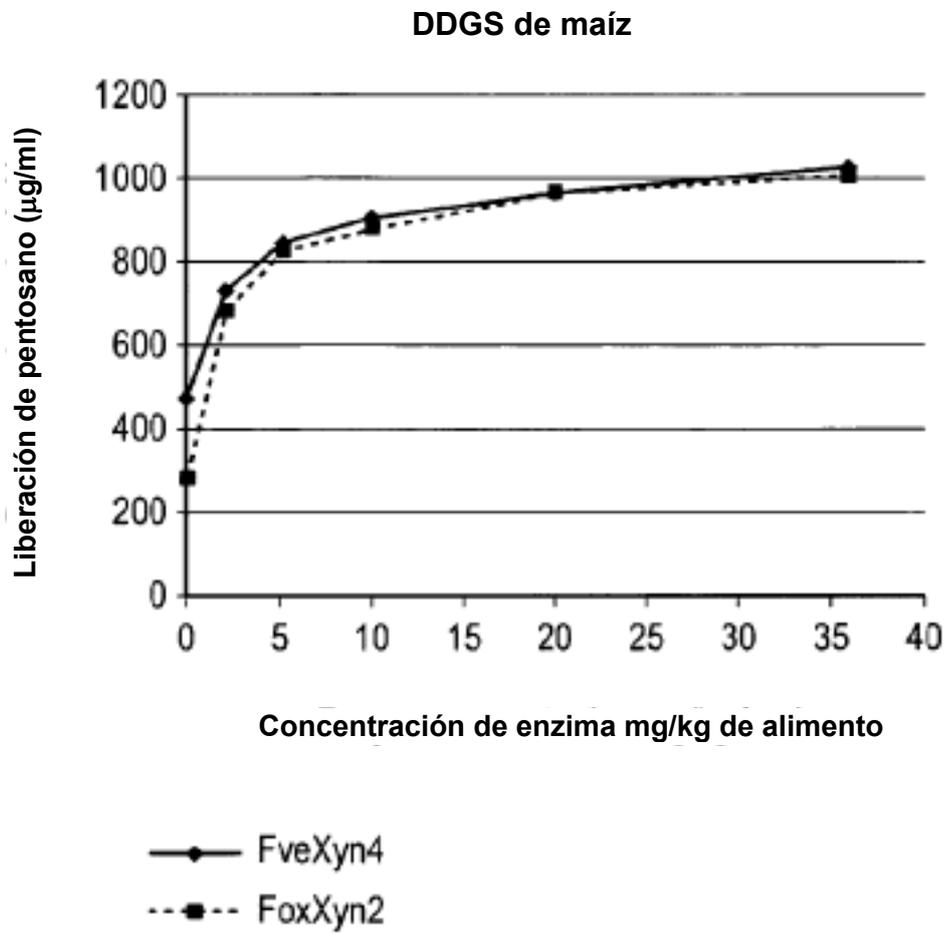


FIG. 29

FIGURA 30

(SEQ ID N° 16)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
 TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTC
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
 GAGCCAGCCAGGGCAACTTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTAC
 CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGgtatgtttcttgccctgaccttctca
aagatgaatttgctaacatgttcagGACGTTGTCAACGAGATCTTCGACTTGGGACGGTACCCTCCG
 AAAGGATTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCC
 GCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGA
 CTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTC
 AGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCCAGTCTCACCTTGACCCCGGTGCCG
 CTGGCCAATCCAGGGTGTCTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGC
 CATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTACCCAAG
 GCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAA
 CTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCTTCTGTTCGACTCCAACTACAACCCCAAGCCT
 GCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 31

(SEQ ID N°. 17)

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA
TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTC
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC
GAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTGTCAACTTTGCTCA
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG
TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCAC
CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTTGTCAACGAGATC
TTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGATTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGA
TGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG
TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG
TCCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCA
GTCTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC
AACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCA
ACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCAC
CGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGA ACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTC
GACTCCA ACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 32

(SEQ ID N° 18)

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGA
ACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAA
GGACACCGCCGTCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTCACCCCCGAGAACTCGGGCAA
GTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTC
GTCAACTTTGCICAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTC
TCAGCTCCCTCAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTG
AGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGT
IGTCAACGAGATCTTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGATTCTCACTTCAACAACG
TCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCC
CAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTC
ACCAAGGGCATGGTCCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGAC
GGCATTGGCTCCCAGTTCTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAGTCAGGGTGCTC
TCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCG
CACTGCCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAAACGTCCCCAAG
TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACG
ACAGCCTTCTGTTCGACTCCAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAAC
GCTCTCCGCTAA