

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 383**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47	(2006.01) A23K 50/80	(2006.01)
C12P 19/04	(2006.01) A23L 29/00	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01) C12N 9/24	(2006.01)
C12P 7/06	(2006.01)	
C12C 5/00	(2006.01)	
C12C 7/01	(2006.01)	
C12C 7/04	(2006.01)	
A23K 20/189	(2006.01)	
A23K 50/75	(2006.01)	
A23K 50/30	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015 PCT/EP2015/051979**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114110**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 15703921 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 3099793**

54 Título: **Proteína**

30 Prioridad:

31.01.2014 GB 201401699

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

30.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LORENTSEN, RIKKE HOEEGH;
ARENT LUND, SUSAN;
HAANING, SVEND;
NIKOLAEV, IGOR;
BARENDS, SHARIEF;
HENDRIK A VAN TUIJL, JAN y
KOOPS, BART**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 776 383 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

Proteína

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevas xilanasas sintéticas y al uso de dichas xilanasas en aplicaciones, que incluyen en piensos, en la elaboración de cerveza o el malteado, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilano tales como materias basadas en grano, por ejemplo, en la producción de biocombustible u otros productos de fermentación, que incluyen productos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base bio), y/o en la industria de separación de gluten de trigo-almidón, y a métodos que usan dichas xilanasas, así como a composiciones (tal como composiciones de aditivos para piensos) que comprenden dichas xilanasas.

10 **Antecedentes de la invención**

15 Durante muchos años, se han usado endo- β -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (denominadas en la presente memoria xilanasas) para la modificación de carbohidratos complejos derivados de material de pared celular vegetal. Es bien conocido en la técnica que la funcionalidad de diferentes xilanasas (derivadas de diferentes microorganismos o plantas) difiere enormemente. Xilanasas es el nombre dado a una clase de enzimas que degradan el polisacárido lineal beta-1,4-xilano en xilooligosacáridos o en xilosa, descomponiendo con ello la hemicelulosa, uno de los componentes principales de la pared celular vegetal.

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

20 Inicialmente todas las xilanasas conocidas y caracterizadas pertenecían a las familias GH10 o GH11. Trabajos posteriores identificaron después numerosos tipos adicionales de xilanasas que pertenecen a las familias GH5, GH7, GH8 y GH43 (Collins et al (2005) FEMS Microbiol Rev., 29 (1), 3-23).

25 Hasta ahora la familia GH11 difiere de todas las demás GH's, siendo la única familia que solo consiste en xilanasas específicas de xilano. La estructura de las xilanasas GH11 puede describirse como una estructura enrollada de β -gelatina o una estructura plegada en sándwich de cadena β (Himmel et al 1997 Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65, 315-325). Las enzimas GH11 tienen un dominio catalítico de aproximadamente 20 kDa.

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

30 Las estructuras tridimensionales están disponibles para un número grande de enzimas de la familia GH10, siendo las primeras resueltas las de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (Derewenda et al J Biol Chem 1994 19 ago; 269 (33) 20811-4), the endo-glicanasa Cex de *C. fimi* (White et al, Biochemistry 1994 25 oct; 33 (42) 12546-52), y la Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (previamente xilanasas A de *Pseudomonas fluorescens* subsp.) (Harris et al Structure 1994, 15 Nov; 2 (11) 1107-16.). Como miembros del Clan GHA, presentan un clásico pliegue de barril (α/β)₈ TIM con los dos sitios activos clave de ácido glutámico localizados en los extremos C-terminales de las cadenas beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat et al Proc Natl Acad Sci U S A 1995 18 Jul; 92 (15) 7090-4).

35 Se han llevado a cabo amplios estudios de caracterización de la funcionalidad de las xilanasas con sustratos puros y bien caracterizados (Kormelink et al., 1992 "Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes". Tesis Doctoral, Agricultural University Wageningen, Holanda (175 pp., resúmenes en inglés y en holandés)). Estos estudios muestran que diferentes xilanasas presentan diferentes requerimientos específicos con respecto a la sustitución de la cadena principal de xilosa del arabinoxilano (AX). Algunas xilanasas requieren tres residuos de xilosa sin sustituir para hidrolizar la cadena principal de xilosa; otras requieren solo uno o dos. Las razones para estas diferencias de especificidad se cree que se deben a la estructura tridimensional dentro de los dominios catalíticos, que a su vez es dependiente de la estructura primaria de la xilanasas, es decir, de la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la traducción de estas diferencias en las secuencias de aminoácido a diferencias en la funcionalidad de las xilanasas, no ha sido documentada cuando la xilanasas actúa en un entorno complejo, tal como un material vegetal, por ejemplo, en un pienso.

40 Los sustratos de xilanasas en el material vegetal, por ejemplo, en el trigo, tradicionalmente han sido divididos en dos fracciones: el AX no extraíble en agua (WU-AX) y el AX extraíble en agua (WE-AX). Se han propuesto numerosas explicaciones a porqué existen dos fracciones diferentes de AX. La bibliografía más antigua (D'Appolonia y MacArthur - (1976, Cereal Chem. 53. 711-718) y Montgomery y Smith (1955, J. Am. Chem. Soc. 77. 3325-332) describe diferencias bastante elevadas en el grado de sustitución entre WE-AX y WU-AX. El mayor grado de sustitución se observó en WE-AX. Esto se usó para explicar por qué parte del AX era extraíble. El mayor grado de sustitución hace que el polímero sea soluble, en comparación con un grado de sustitución menor, que podría producir la formación de enlaces de hidrógeno entre polímeros y por consiguiente su precipitación.

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

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

Breve descripción de las figuras

10 La Figura 1: muestra el polipéptido maduro de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn92 (SEQ ID No. 1).

La Figura 2: muestra la secuencia de polinucleótido de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn92 (SEQ ID No. 2).

La Figura 3: muestra el polipéptido maduro de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn85 (SEQ ID No. 3).

15 La Figura 4: muestra la secuencia de polinucleótido de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn85 (SEQ ID No. 4).

La Figura 5: muestra el polipéptido maduro de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn89 (SEQ ID No. 5).

20 La Figura 6: muestra la secuencia de polinucleótido de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn89 (SEQ ID No. 6).

La Figura 7: muestra el polipéptido maduro de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn72 (SEQ ID No. 7).

La Figura 8: muestra la secuencia de polinucleótido de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn72 (SEQ ID No. 8).

25 La Figura 9: muestra el polipéptido maduro de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn80 (SEQ ID No. 9).

La Figura 10: muestra la secuencia de polinucleótido de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn80 (SEQ ID No. 9).

30 La Figura 11: muestra el polipéptido maduro de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn93 (SEQ ID No. 11).

La Figura 12: muestra la secuencia de polinucleótido de una xilanasas sintética designada en la presente memoria como SynXyn93 (SEQ ID No. 12).

La Figura 13: muestra un mapa esquemático del vector de expresión correspondiente a las xilanasas sintéticas (pTTTpyr2-synXyn_VAR).

35 La Figura 14: muestra un alineamiento de las secuencias de polipéptido maduro de las xilanasas sintéticas – se usó el alineamiento de secuencia múltiple CLUSTAL Omega con los parámetros por defecto (Matrix: Gonnet; Gap Opening Penalty: 10; Gap Extension: 0.2).

La Figura 15: muestra los resultados de un ensayo de peletizado para determinar la estabilidad de procesamiento de la xilanasas sintética SynXyn92 – a temperaturas de procesamiento de 90°C.

40 La Figura 16: muestra la reducción de la viscosidad en materias basadas en grano de la enzima sintética SynXyn93 según la presente invención en comparación con una enzima de control positivo. Estos datos muestran que la enzima SynXyn93 no tiene actividad durante la etapa de pretratamiento (60°C), pero se activa en la etapa de licuefacción (85°C). La reducción de la viscosidad continúa durante la etapa de licuefacción a 85°C, lo que indica que SynXyn93 presenta una actividad significativa a dicha temperatura elevada. Las viscosidades finales con SynXyn93 son un 52-45 55% inferiores que el blanco.

La Figura 17: muestra la reducción de viscosidad en materias basadas en grano de la enzima sintética SynXyn93 según la presente invención, en comparación con una enzima de control positivo. Estos datos confirman el aumento de termoestabilidad de la SynXyn93 en comparación con la enzima de control positivo. SynXyn93 muestra una reducción de la viscosidad de 54-60% en comparación con el blanco, mientras que para la enzima de control positivo solo es de 40-41%. La viscosidad final con SynXyn93 es inferior a la de la enzima de control positivo.

50

Sumario de la invención

Un descubrimiento trascendental de la presente invención es que se pueden diseñar xilanasas sintéticas que además de presentar la capacidad de descomponer (solubilizar) arabinoxilanos insolubles (AXinsol), presentan otras propiedades que las hacen especialmente útiles en aplicaciones tales como piensos, elaboración de cerveza o malteado, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilanos como las materias basadas en grano, por ejemplo, en la producción de biocombustibles u otros productos de fermentación, que incluyen compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base bio), y/o en la industria de separación de gluten de trigo-almidón. Por ejemplo, las xilanasas sintéticas incluidas en la presente memoria son sorprendentemente termoestables, presentan una recuperación sorprendentemente alta, por ejemplo, actividad residual tras calentamiento térmico (por ejemplo, durante el proceso de peletizado) y son resistentes a pepsina.

Durante el proceso de peletizado la enzima (por ejemplo, un pienso que comprende la enzima) es acondicionada durante 30 segundos a 90°C.

Durante el proceso de peletizado una enzima se puede formular sobre un sustrato, por ejemplo, trigo, y puede formularse en una premezcla, por ejemplo, una mezcla de pienso de maíz/soja (tal como 61,1% de maíz, 31,52% de soja Hipro 48, 4,00% de aceite de soja, 0,40% de bicarbonato sódico, 0,25% de vitaminas/minerales Leghennen, 0,20% de DL-metionina, 1,46% de fosfato dicálcico, 1,16% de caliza).

La xilanasas puede incluirse en un nivel que asegure que se alcanza una dosis final objetivo, por ejemplo, 20 000 XU/kg de pienso. La premezcla se puede preparar mezclando la(s) enzima(s) formulada(s) sobre el sustrato, por ejemplo, trigo, en una mezcla de pienso, por ejemplo, 10 kg de pienso de maíz/soja, y mezclarse durante un tiempo especificado, por ejemplo, 10 min.

La premezcla puede añadirse al pienso, por ejemplo, 110 kg de pienso, y mezclarse durante un tiempo especificado, por ejemplo, 10 min, antes del acondicionamiento. El pienso que comprende la enzima se acondiciona típicamente durante 30 segundos a 90°C antes del peletizado.

El pienso que comprende la enzima puede ser tratado con vapor seco para alcanzar una temperatura objetivo de 90°C después de 30 segundos.

El término “acondicionado” o “acondicionar” tal como se usa en la presente memoria significa mezclar la mezcla pienso/enzima y tratar a la misma con vapor seco para alcanzar una temperatura objetivo de 90°C después de 30 segundos.

Después del acondicionamiento, la mezcla pienso/enzima puede ser conformada en pelets. La formación de los pelets se puede realizar mediante cualquier método convencional conocido por el especialista en la técnica. Los pelets pueden conformarse mediante el proceso de peletizado descrito en la presente memoria.

Por vez primera, los presentes inventores han sido capaces de expresar polipéptidos completamente sintéticos que tienen actividad de xilanasas y propiedades mejoradas.

Las xilanasas sintéticas presentadas en la presente memoria son xilanasas GH10.

En particular, las xilanasas sintéticas de la presente invención descomponen (solubilizan) de forma eficiente AXinsol procedente de un amplio abanico de sustratos, que incluye maíz, trigo, DDGS, etc., en particular maíz y sustratos basados en maíz, en particular productos de trigo (que incluyen los basados en trigo) y de maíz (que incluyen productos basados en maíz). Esto contrasta con las enzimas de la técnica anterior, que a menudo son inferiores para solubilizar AXinsol en sustratos de maíz y basados en maíz, o que no son eficientes en sustratos basados en trigo y maíz.

Adicionalmente, las xilanasas sintéticas de la presente invención pueden ser particularmente buenas no solo para descomponer (solubilizar) AXinsol, sino también para descomponer (o degradar) los polímeros solubilizados de una forma eficiente. Al ser capaces de descomponer (degradar) eficientemente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos al disolver AXinsol), se obtiene una (rápida) reducción de la viscosidad o los polímeros solubilizados (obtenidos al disolver AXinsol) no pueden contribuir a aumentar la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

Sin pretender establecer ninguna teoría, la enzima sintética de la presente invención principalmente libera polímeros, que no contribuyen a la viscosidad, ya que los polímeros liberados son cortos.

Típicamente, las xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, pero a menudo conducen a un aumento de la viscosidad de la mezcla. Dicha viscosidad incrementada no es ventajosa para muchas aplicaciones.

Sin pretender establecer ninguna teoría, aunque algunas xilanasas convencionales descomponen AXinsol, conducen a un aumento de los productos de degradación solubles de alto peso molecular, lo que conduce a un aumento de la viscosidad de la mezcla.

Adicional o alternativamente, y de nuevo sin pretender establecer ninguna teoría, las enzimas xilanasas convencionales pueden descomponer 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. Por el contrario, con los métodos y usos de la presente invención, las xilanasas sintéticas descomponen AXinsol sin aumentar la viscosidad y/o a la vez que reducen rápidamente la viscosidad en comparación con las enzimas convencionales. Sin pretender establecer ninguna teoría, se cree que las enzimas de la presente invención no forman productos de alto peso molecular.

Se ha observado que las enzimas de la presente invención, tal como se describe en la presente memoria, no solo descomponen (solubilizan) los arabinoxilanos insolubles (AXinsol) de un amplio abanico de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular sustratos de maíz y basados en maíz, en particular productos de trigo (que incluyen los basados en trigo) y de maíz (que incluyen productos basados en maíz), sino que también aseguran de forma eficiente que la viscosidad no aumenta y/o que la viscosidad se reduce. Sin pretender establecer ninguna teoría, se cree que las enzimas de la presente invención no forman productos de alto peso molecular.

Por tanto, la presente invención se refiere a enzimas capaces de solubilizar pentosanos, en particular materias que contienen xilanos, tal como arabinoxilanos, en particular arabinoxilanos insolubles. En particular, la enzima es particularmente buena solubilizando pentosanos, en particular materiales que contienen xilanos, tal como arabinoxilanos, en particular arabinoxilanos insolubles, en un amplio espectro de sustratos, que incluyen sustratos basados en maíz.

Muchas de las xilanasas comercializadas para uso en piensos para solubilizar pentosanos son enzimas GH11. Los especialistas en la técnica habían considerado que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes solubilizando pentosanos, particularmente AXinsol, en comparación con las xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha descubierto que las xilanasas sintéticas descritas en la presente memoria, que son xilanasas GH10, son particularmente buenas en la degradación de AXinsol en un amplio espectro de sustratos, que incluyen sustratos basados en maíz. Sorprendentemente, los presentes inventores han descubierto que las xilanasas sintéticas GH10 de la presente invención superan a las xilanasas GH11 comerciales en su capacidad para solubilizar pentosanos. Además, las xilanasas sintéticas GH10 son termoestables.

El hecho de que las presentes encimas degraden eficientemente AXinsol de maíz y sustratos basados en maíz es significativamente ventajoso, y que el maíz contiene mucho más AX en forma insoluble que otros cereales, tal como por ejemplo el trigo o el centeno. Por lo tanto, solo las xilanasas que pueden descomponer AXinsol pueden proporcionar un beneficio significativo para animales alimentados con dietas basadas en maíz, tal como una dieta de maíz-soja, por ejemplo.

Fue totalmente inesperado que una xilanasas GH10 fuera tan buena degradando AXinsol en cereales, particularmente en maíz o sustratos basados en maíz.

Las enzimas de la presente invención pueden ser capaces de degradar eficientemente (y rápidamente) los polímeros y oligómeros que se producen en la degradación de AXinsol o que están presentes en material basado en grano. Esto conduce a una ventaja inesperada para las xilanasas sintéticas presentadas en la presente memoria, ya que son particularmente buenas en una serie de aplicaciones para mantener la viscosidad baja o para reducir la viscosidad, por ejemplo, en piensos; en la elaboración de cerveza y/o el malteado; en la producción de glucosa basada en grano, por ejemplo, para un procesado adicional a biocombustibles y/o biocombuestos (por ejemplo, isopreno de base bio); o en la industria de separación de gluten de trigo-almidón para la producción de almidón, por ejemplo.

De forma destacable, se ha descubierto que el producto de degradación es de media más corto para las enzimas sintéticas evaluadas en la presente memoria que para las enzimas GH11. Esto significa que los productos de degradación no contribuyen o producen un aumento de la viscosidad.

En base a estos descubrimientos, las xilanasas sintéticas según la presente invención pueden usarse para degradar una materia que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente AXinsol. Adicional o alternativamente, las xilanasas según la presente invención pueden usarse para degradar polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que son producidos en la degradación de AXinsol o que están presentes (de forma natural) en materias basadas en grano. De forma sorprendente se ha descubierto que las variantes de xilanasas según la presente invención pueden usarse para degradar una materia que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente AXinsol, y para degradar polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que son producidos en la degradación de AXinsol.

Dichas enzimas encuentran una aplicación útil en muchas industrias, que incluyen piensos, malteado y elaboración de cerveza, en el tratamiento de materias primas que contiene arabinoxilano como las materias basadas en grano, en la industria de separación de gluten de trigo-almidón, en la producción de jarabes derivados de almidón, en la producción de biocombustibles, y similares.

55 **Declaraciones de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de xilanasas, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 89% (de forma adecuada de al menos el 90%, de forma adecuada de al menos el 92%, de forma adecuada de al menos el 94%, de forma adecuada de al menos el 98%, de forma adecuada de al menos el 100%) con la SEQ ID NO: 1;

5 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de al menos el 89% (de forma adecuada de al menos el 90%, de forma adecuada de al menos el 92%, de forma adecuada de al menos el 94%, de forma adecuada de al menos el 98%, de forma adecuada de al menos el 100%) con la SEQ ID NO: 2; o

(c) un fragmento de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o codificado por la secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, fragmento que es al menos el 60% de la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 y que tiene actividad de xilanasas.

10 En un aspecto adicional la presente invención proporciona un polinucleótido aislado (por ejemplo, ADNc) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la presente invención.

En otro aspecto adicional, se proporciona un polinucleótido aislado (por ejemplo, ADNc) que comprende un polinucleótido que tiene una identidad de al menos el 87% (de forma adecuada de al menos el 89%, de forma adecuada de al menos el 90%, de forma adecuada de al menos el 92%, de forma adecuada de al menos el 94%, de forma adecuada de al menos el 98%, de forma adecuada de al menos el 100%) con la SEQ ID NO: 2; o un polinucleótido aislado que difiere de la SEQ ID No. 2 debido a la degeneración del código genético.

15 La presente invención proporciona además un polinucleótido aislado (por ejemplo, ADNc) seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12, o un polinucleótido aislado que difiere de SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12 debido a la degeneración del código genético.

En un aspecto la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la presente invención ligado operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un hospedante de expresión.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la presente invención.

Se proporciona adicionalmente una célula hospedante recombinante que comprende un polinucleótido según la presente invención, una construcción de ácido nucleico de la presente invención o un vector según la presente invención.

30 La presente invención proporciona además un método para producir el polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivar una célula hospedante que comprende una construcción de ácido nucleico según la presente invención en condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

La presente invención proporciona además una composición enzimática que comprende una xilanasas sintética según la presente invención.

35 La presente invención proporciona además una composición de aditivo para pienso que comprende una enzima xilanasas sintética según la presente invención.

En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una premezcla que comprende a) una enzima xilanasas sintética según la presente invención, b) la composición enzimática según la presente invención o c) una composición de aditivo para pienso según la presente invención; y al menos una vitamina y/o al menos un mineral.

40 La presente invención proporciona además un pienso (o alimento tipo pienso) que comprende a) una enzima xilanasas sintética según la presente invención, b) la composición enzimática según la presente invención, c) una composición de aditivo para pienso según la presente invención o d) una premezcla según la presente invención.

45 La presente invención proporciona además un método para degradar materia que contenga arabinosilano en una materia que contiene xilano, que comprende mezclar dicha materia que contiene xilano con a) una enzima xilanasas sintética según la presente invención, b) la composición enzimática según la presente invención, c) una composición de aditivo para pienso según la presente invención o d) una premezcla según la presente invención.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido habitualmente por el especialista en la técnica a la que pertenece la 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) le proporcionan al especialista un diccionario general de los términos usados en esta descripción.

- 5 Esta descripción no está limitada a los ejemplos de métodos y materiales descritos en la presente memoria, y se pueden usar cualesquier métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para llevar a la práctica o para evaluar las realizaciones de esta descripción. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácido nucleico están escritas de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3'; las secuencias de aminoácido están escritas de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi, respectivamente.
- 10 Los títulos proporcionados en la presente memoria no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de esta descripción, que pueden ser considerados en referencia a la especificación en su conjunto. Por consiguiente, los términos definidos a continuación se definen de forma más completa en referencia a la especificación en su conjunto.
- En la presente memoria los aminoácidos son referidos usando el nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una única letra.
- El término "proteína", tal como se usa en la presente memoria, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.
- 15 Tal como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".
- 20 Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan de forma intercambiable en la presente memoria. En la presente descripción y reivindicaciones, se pueden usar los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los residuos de aminoácido. El código de 3 letras para aminoácidos se define en conformidad con la "Joint Commission on Biochemical Nomenclature" (JCBN) de IUPACIUB. También se entiende que un polipéptido puede estar codificado por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.
- 25 A lo largo de la especificación pueden aparecer otras definiciones de términos. Antes de describir más en detalle los ejemplos de realizaciones, debe entenderse que esta descripción no está limitada a las realizaciones particulares descritas, ya que como tal puede, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es para el propósito de describir meramente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa, ya que el alcance de la presente descripción estará limitado solo por las reivindicaciones anexas.
- 30 Cuando se proporciona un rango de valores, debe entenderse que cada valor implicado, hasta la décima de unidad del límite inferior, a menos que el contexto claramente dicte lo contrario, entre los límites superior e inferior de dicho rango también está específicamente incluido. Todo rango menor entre cualquier valor enunciado en un rango enunciado y cualquier otro valor enunciado o implicado en dicho rango enunciado queda abarcado dentro de esta descripción. Los límites superior e inferior de dichos rangos más pequeños pueden incluirse o excluirse en el rango de forma independiente, y todo rango en el que uno, ninguno o ambos límites estén incluidos en los rangos más pequeños también está contemplado dentro de esta descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango enunciado. Cuando el rango enunciado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de dichos límites incluidos también son incluidos en esta descripción.
- 35 Cabe destacar que tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una", y "el/la" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto claramente dicte lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de dichos agentes candidatos y la referencia a "el pienso" incluye referencia a uno o más piensos y equivalentes de los mismos conocidos por los especialistas en la técnica, etc.
- 40 Las publicaciones discutidas en la presente memoria se proporcionan únicamente por su descripción previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de la presente memoria debe considerarse como una admisión de que dichas publicaciones constituyen técnica anterior a las reivindicaciones anexadas.
- 45 El aumento de los precios de las materias primas usadas tradicionalmente como fuente de energía en piensos para animales, como materia prima en la producción de biocombustible, como ingrediente en la elaboración de la cerveza o el malteado, o como materia prima en los procesos de separación de gluten de trigo-almidón, por ejemplo, ha dado como resultado la inclusión de materiales fibrosos de bajo coste en los sustratos de partida para dichas industrias, particularmente el uso de sub-productos fibrosos de bajo coste en piensos para animales.
- 50 La adición de fibra puede producir varios efectos desventajosos. Por ejemplo, la adición de fibra a pienso para animales puede causar efectos anti-nutricionales. En piensos, la hemicelulosa y la celulosa (que incluyen arabinoxilano) forman barreras físicas que encapsulan (o atrapan) nutrientes como el almidón y la proteína, impidiendo con ello el acceso a dichos nutrientes para el animal.
- 55 La hemicelulosa y la celulosa (incluyendo los arabinoxilanos insolubles (AXinsol)) son también en sí mismas fuentes de energía potenciales, ya que consiste en sacáridos C5 y C6. Los monosacáridos C6 pueden usarse como fuente de energía por parte de un animal, mientras que los sacáridos C5 pueden ser transformados 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), que pueden ser captados y digeridos por el intestino del animal.

La liberación de nutrientes en piensos como consecuencia de la degradación de la barrera física depende de la capacidad de la xilanasa para degradar los componentes de fibra insoluble (por ejemplo, arabinosilanos insolubles (AXinsol)).

5 En la presente memoria se describe un polipéptido aislado que tiene actividad de xilanasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 87% con la SEQ ID NO: 1;

(b) un polipéptido codificado por un nucleótido que tiene una identidad de al menos 87% con la SEQ ID NO: 2; o

(c) un fragmento de un polipéptido de a) o b), fragmento que presenta actividad de xilanasa.

10 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de xilanasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos 89% con la SEQ ID NO: 1;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 89% con la SEQ ID NO: 2; o

15 (c) un fragmento de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o codificado por la secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, fragmento que es al menos el 60% de la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 y que presenta actividad de xilanasa.

En una realización, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de xilanasa, seleccionado del grupo que consiste en:

20 (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 90% con la SEQ ID NO: 1;

(b) un polipéptido codificado por un nucleótido que tiene una identidad de al menos 90% con la SEQ ID NO: 2; o

(c) un fragmento de un polipéptido de a) o b), fragmento que presenta actividad de xilanasa.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de xilanasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 94% con la SEQ ID NO: 1;

(b) un polipéptido codificado por un nucleótido que tiene una identidad de al menos 94% con la SEQ ID NO: 2; o

(c) un fragmento de un polipéptido de a) o b), fragmento que presenta actividad de xilanasa.

30 En otra realización adicional, la presente invención proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad de xilanasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98% con la SEQ ID NO: 1;

(b) un polipéptido codificado por un nucleótido que tiene una identidad de al menos 98% con la SEQ ID NO: 2; o

35 (c) un fragmento de un polipéptido de a) o b), fragmento que presenta actividad de xilanasa.

El polipéptido según la presente invención puede comprender una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11.

40 En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad de xilanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 87% con una de las secuencias de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11.

En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad de xilanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 93% con una de las secuencias de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11.

45 En la presente memoria se describe un polipéptido que tiene actividad de xilanasa, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos 98% con una de las secuencias de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11.

- En una realización, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11.
- 5 En una realización específica, el polipéptido que tiene actividad de xilanasas comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 1.
- En una realización adicional, el polipéptido según la presente invención puede consistir en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11.
- 10 En la presente memoria se describe que el polipéptido puede estar codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 87% con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12; o una identidad de al menos 87% con un polinucleótido que difiere de SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12 debido a la degeneración del código genético.
- 15 En la presente memoria se describe que el polipéptido puede estar codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 93% con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12; o una identidad de al menos 93% con un polinucleótido que difiere de SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12 debido a la degeneración del código genético.
- 20 En la presente memoria se describe que el polipéptido puede estar codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 95% con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12; o una identidad de al menos 95% con un polinucleótido que difiere de SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12 debido a la degeneración del código genético.
- En una realización preferida, el polipéptido de la presente invención está codificado por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12; o un polinucleótido que difiere de SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12 debido a la degeneración del código genético.
- 25 En una realización, el polipéptido de la presente invención está codificado por un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 2 o un polinucleótido que difiere de la SEQ ID No. 2 debido a la degeneración del código genético.
- De forma adecuada, las secuencias de ácido nucleico o de polinucleótido incluidas en la presente memoria pueden ser ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o ARN.
- 30 En una realización, las secuencias de ácido nucleico o de polinucleótido incluidas en la presente memoria pueden ser ADN más preferiblemente ADNc.
- En una realización, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la presente invención ligado operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un hospedante de expresión.
- 35 También se contempla un vector de expresión recombinante que comprende la construcción de ácido nucleico de la presente invención o polinucleótidos de la presente invención; y células hospedantes (por ejemplo, células hospedantes recombinantes) que comprenden la construcción de ácido nucleico de la presente invención o los polinucleótidos de la presente invención; o vectores según la presente invención.
- 40 En una realización, se presenta un método para producir el polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivar una célula hospedante que comprende una construcción de ácido nucleico según la presente invención en las condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
- El polipéptido así producido puede ser recuperado. El polipéptido así producido puede ser usado como parte de un fermentato o puede aislarse y/o purificarse para producir una xilanasas sintética aislada o purificada.
- En una realización preferida, la xilanasas sintética producida según un método de la presente invención es recuperada.
- 45 En una realización preferida, la xilanasas sintética producida según un método de la presente invención es aislada y/o purificada.
- En algunas realizaciones, la xilanasas sintética puede usarse sintéticamente como fermentato sin aislamiento y/o purificación de la enzima.
- 50 La célula hospedante de la presente invención puede seleccionarse del grupo que consiste en una célula bacteriana, célula fúngica, célula de levadura, una célula fúngica filamentosa y una célula vegetal. Preferiblemente, la célula hospedante es una célula bacteriana o fúngica.

En una realización, la xilanasa sintética preferiblemente es una endoxilanasa, por ejemplo, una endo-1,4-β-d-xilanasa. La clasificación correspondiente a una endo-1,4-β-d-xilanasa es E.C. 3.2.1.8.

En la presente memoria se describe que el polipéptido de la presente invención tiene un 40% de actividad residual de la actividad de xilanasa tras incubación a 65°C durante 10 minutos a pH 6.

- 5 En una realización preferida, el polipéptido de la presente invención tiene un 50% de actividad residual de la actividad de xilanasa tras incubación a 65°C durante 10 minutos a pH 6.

En una realización preferida, el polipéptido de la presente invención tiene un 80% de actividad residual de la actividad de xilanasa tras incubación a 61°C durante 10 minutos a pH 6.

- 10 De forma adecuada, el polipéptido de la presente invención tiene una actividad residual de al menos 70% cuando se incubaba con 0,2 mg/mL en una disolución tamponada a pH 3,5 durante dos horas a una temperatura de 40°C.

En una realización preferida, el polipéptido de la presente invención tiene una actividad residual de al menos 60% después de que un pienso que comprende el polipéptido haya sido tratado con vapor seco para alcanzar una temperatura de 90°C tras 30 segundos.

- 15 En una realización preferida, el polipéptido de la presente invención tiene una actividad residual de al menos 60% después de que un pienso que comprende el polipéptido haya sido acondicionado durante 30 segundos a 90°C, por ejemplo, como parte de un proceso de peletizado.

En una realización preferida, la xilanasa sintética según la presente invención tiene un valor de T_m superior a 65°C (preferiblemente superior a 69°C, preferiblemente superior a 73°C), donde el valor de T_m se mide como la temperatura a la que se obtiene el 50% de actividad residual tras 10 min de incubación.

- 20 La termoestabilidad de la xilanasa sintética según la presente invención puede determinarse usando el "Ensayo para medir la termoestabilidad" (ver a continuación).

Ensayo para medir la termoestabilidad

- 25 Los perfiles de desnaturalización térmica de las xilanasas sintéticas se midieron diluyendo y pre-incubando las muestras de enzima en tampón MES 25 mM, pH 6,0 durante 10 minutos a temperatura variable (por ejemplo, 61, 65, 69 y 73°C, respectivamente) y midiendo posteriormente la actividad residual mediante el Ensayo de Actividad de xilanasa descrito en el Ejemplo 2. La actividad medida sin pre-incubación se fijó en el 100% y la actividad residual de cada xilanasa sintética a cada temperatura se calculó referida a la misma. El valor de T_m se calcula a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la cual se obtiene el 50% de actividad residual.

- 30 Los detalles completos del ensayo de medida de termoestabilidad se pueden encontrar en el Ejemplo 2 (ver "Ensayo de termoestabilidad").

La actividad residual de cada xilanasa sintética se calculó como la ratio entre la actividad medida para las muestras de enzima sometidas a estrés (tratadas con calor) y no sometidas a estrés (no tratadas con calor), respectivamente: (Actividad de blanco media de muestra sometida a estrés)/(Actividad media de blanco de muestra no sometida a estrés).

- 35 En una realización, se considera que una xilanasa sintética es termoestable según la presente invención si presenta un valor de T_m superior a 65°C, donde el valor de T_m es la temperatura a la cual se obtiene el 50% de actividad residual tras 10 min de incubación. Dicho valor de T_m puede medirse de acuerdo al ensayo de medida de termoestabilidad incluido en la presente memoria.

- 40 En una realización, se considera que una xilanasa sintética es termoestable según la presente invención si presenta un valor de T_m superior a 69°C, donde el valor de T_m es la temperatura a la cual se obtiene el 50% de actividad residual tras 10 min de incubación. Dicho valor de T_m puede medirse de acuerdo al ensayo de medida de termoestabilidad incluido en la presente memoria.

- 45 En una realización, se considera que una xilanasa sintética es termoestable según la presente invención si presenta un valor de T_m superior a 73°C, donde el valor de T_m es la temperatura a la cual se obtiene el 50% de actividad residual tras 10 min de incubación. Dicho valor de T_m puede medirse de acuerdo al ensayo de medida de termoestabilidad incluido en la presente memoria.

- 50 Una ventaja técnica sorprendente de la xilanasa sintética (o de la composición que comprende la xilanasa sintética) es que es destacadamente buena soportando un tratamiento de calor (por ejemplo, durante el proceso de peletizado, por ejemplo) de hasta aproximadamente 85°C (de forma adecuada hasta aproximadamente 90°C). El tratamiento térmico puede llevarse a cabo durante 30 segundos. Soportar dicho tratamiento térmico significa que al menos aproximadamente el 40%, de forma adecuada al menos el 50%, de la enzima que está presente/activa en el aditivo antes de calentar hasta la temperatura especificada sigue estando presente/activa una vez enfriado a temperatura ambiente. Preferiblemente, al menos aproximadamente el 60% (de forma adecuada al menos aproximadamente el

70%, de forma adecuada al menos aproximadamente el 80%) de la enzima que está presente y activa en el aditivo antes de calentar hasta la temperatura especificada sigue estando presente y activa una vez enfriado a temperatura ambiente.

5 El término “termoestabilidad” es la capacidad de una enzima para resistir una desactivación irreversible (normalmente por desnaturalización) a una temperatura relativamente elevada. Esto significa que la enzima retiene una cantidad especificada de actividad enzimática tras exposición a una temperatura identificada a lo largo de un periodo de tiempo dado.

10 Existen muchas formas para medir la termoestabilidad. A modo de ejemplo, las muestras enzimáticas pueden ser incubadas sin sustrato durante un periodo de tiempo definido (por ejemplo, de 10 min o de 1 a 30 min) a una temperatura elevada comparada con la temperatura a la cual la enzima es estable durante un tiempo mayor (días). Tras la incubación a temperatura elevada la muestra de enzima es evaluada para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30°C (alternativamente 25-50°C o incluso hasta 70°C). La actividad residual se calcula referida a una muestra de la enzima que no ha sido incubada a la temperatura elevada.

15 También se puede medir la termoestabilidad como inactivación de la enzima en función de la temperatura. En este caso, se incuban las muestras enzimáticas sin sustrato durante un periodo de tiempo definido (por ejemplo, 10 min o de 1 a 30 min) a diversas temperaturas y tras la incubación son evaluadas en términos de actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30°C (alternativamente 25-70°C o incluso más). Se calcula la actividad residual a cada temperatura referida a una muestra de la enzima que no ha sido incubada a la temperatura elevada. El perfil de desnaturalización térmica resultante (temperatura frente a actividad residual) se puede usar para calcular la temperatura a la cual se obtiene una actividad residual del 50%. Este valor se define como el valor de T_m .

20 Es más, la termoestabilidad puede medirse como la inactivación de la enzima en función de la temperatura. En este caso las muestras de enzima son incubadas sin sustrato a una temperatura elevada definida (por ejemplo, 76°C) durante diversos periodos de tiempo (por ejemplo, entre 10 s y 30 min) y después de la incubación son evaluadas para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de por ejemplo, 30°C (alternativamente, de 25-70°C o incluso mayor). La actividad residual correspondiente a cada temperatura se calcula referida a una muestra de enzima que no ha sido incubada a la temperatura elevada. El perfil de inactivación resultante (tiempo frente a actividad residual) puede usarse para calcular el tiempo al cual se obtiene el 50% de actividad residual. Éste se suele proporcionar como $T_{1/2}$.

25 Éstos son ejemplos de cómo medir la termoestabilidad. La termoestabilidad también puede medirse mediante otros métodos. Preferiblemente, la termoestabilidad se mide usando el “Ensayo para medir la termoestabilidad” incluido en la presente memoria.

30 Por contraposición a la termoestabilidad, la termoactividad es la actividad de la enzima en función de la temperatura. Para determinar la termoactividad, se pueden incubar muestras de enzima (evaluar) durante el periodo de tiempo definido en el ensayo a diferentes temperaturas en presencia de sustrato. La actividad de enzima se obtiene durante o inmediatamente tras la incubación, según se defina en el ensayo (por ejemplo, leyendo un valor de DO que refleje la cantidad de producto de reacción formado). La temperatura a la cual se obtiene la mayor actividad es la temperatura óptima de la enzima en las condiciones de ensayo dadas. La actividad obtenida para cada temperatura puede calcularse referida a la actividad obtenida en el óptimo de temperatura. Esto proporcionará un perfil de temperatura correspondiente a la enzima en unas condiciones de ensayo dadas.

35 En la presente solicitud, termoestabilidad no es lo mismo que termoactividad.

En algunas realizaciones, la enzima que presenta actividad de xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención debería presentar una buena actividad de xilanasas a un pH de entre aproximadamente 5 y 6.

40 Preferiblemente, la enzima que presenta una actividad de xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de la presente invención retiene más del 70% de la actividad máxima entre pH 4 y 8, de forma adecuada entre pH 4,6 y 7.

En algunas realizaciones, por ejemplo, en aplicaciones para piensos, la enzima que presenta actividad de xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma según la presente invención preferiblemente retiene más del 70% de la actividad máxima entre 4,9 y 6.

45 Sin pretender establecer ninguna teoría, el pH también puede ser un efecto importante en la eficacia y la eficiencia de la enzima. Para aplicaciones de pienso, en particular el perfil de pH de las xilanasas de la presente invención favorece la actividad en el intestino delgado, en condiciones neutras.

La presente invención proporciona además una composición enzimática o una composición de aditivo para pienso que comprende el polipéptido de la presente invención.

La presente invención también proporciona una premezcla que comprende el polipéptido de la presente invención, o la composición enzimática de la presente invención, o una composición de aditivo para pienso según la presente invención y/o al menos un mineral.

5 En algunas realizaciones, la composición de aditivo para pienso según la presente invención o la premezcla según la presente invención comprende además una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una 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)).

10 La xilanasa sintética según la presente invención, o una composición enzimática que comprende la misma puede usarse en un método para degradar material que contiene arabinoxilano en un material que contiene xilano.

De forma adecuada, el arabinoxilano puede ser arabinoxilano insoluble (AXinsol).

En una realización, el material que contiene xilano se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en: un pienso o materia para pienso; un componente de pienso; un material basado en grano; una pulpa; un mosto; una malta; cebada malteada; un adjunto, una pulpa de cebada; y una harina de cereal.

15 En una realización, los arabinoxilanos se solubilizan sin aumentar la viscosidad en el medio de reacción.

En una realización de la presente invención, el pienso o componente de pienso comprende o consiste en maíz, DDGS (tal como cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de los mismos.

En una realización preferida, el pienso o componente de pienso es un pienso basado en maíz.

20 La xilanasa sintética según la presente invención puede usarse en combinación con una o más 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. 3.2.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), lípido acil-transferasas (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 (por ejemplo 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o a 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), amilasas, alfa-amilasas (E.C. 3.2.1.1), otras xilanasas (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.2.1.72, E.C. 3.2.1.136), glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3), hemicelulasas, proteasas (por ejemplo subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)), enzimas desramificantes, cutinasas, esterasas y/o mannanasas (por ejemplo una β -mannanasa (E.C. 3.2.1.78)).

30 La xilanasa sintética según la presente invención puede usarse en combinación con una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una proteasa (por ejemplo, subtilisinas (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una 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)).

35 En una realización, el método o uso según la presente invención comprende administrar a un sujeto una enzima xilanasa sintética según la presente invención, o una composición enzimática que comprende una xilanasa sintética según la presente invención, o una composición de aditivo para pienso que comprende una xilanasa sintética según la presente invención, o una premezcla que comprende una xilanasa sintética según la presente invención o un pienso que comprende una xilanasa sintética según la presente invención.

En una realización, el método o uso de la presente invención es (al menos en parte) un proceso de separación de gluten de trigo-almidón.

40 En otra realización, el método o uso de la presente invención es (al menos en parte) un proceso de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) o bioproducto (por ejemplo, isopreno de base bio).

En otra realización, el método o uso de la presente invención es (al menos en parte) un proceso de malteado o de elaboración de cerveza.

45 De forma adecuada, en la presente invención se contempla una bebida fermentada, por ejemplo, cerveza, producida mediante un método según la presente invención.

Tanto las secuencias de polipéptido como las secuencias de ácido nucleico incluidas en la presente memoria preferiblemente son aisladas.

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

En un aspecto de la invención, la xilanasa de la invención es una xilanasa de la familia de Glicosido Hidrolasa (GH) 10. El término “familia de Glicosido Hidrolasa (GH) 10” significa que la xilanasa en cuestión se clasifica, o puede clasificarse, en la familia GH 10.

5 Búsquedas de similitud de proteína (por ejemplo, blast de proteína en http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) pueden determinar si una secuencia desconocida entra en el término de un miembro de la familia de xilanasas GH10, particularmente la familia GH puede categorizarse en base a la homología de secuencia en regiones clave. Adicional o alternativamente, para determinar si una secuencia de proteína desconocida es una proteína xilanasa dentro de la familia GH10, la evaluación se puede realizar, no solo con la similitud/homología/identidad de secuencia, sino también con la similitud de estructura 3D. La clasificación de las familias GH a menudo se basa en el plegamiento 3D. Un software que predice el plegamiento 3D de una secuencia de proteína desconocida es el HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). La potencia de este software para la predicción de estructuras proteicas se basa en la identificación de secuencias homólogas con estructura conocida a usar como plantilla. Esto funciona tan bien porque las estructuras divergen mucho más lentamente que las secuencias primarias. Las proteínas de la misma familia pueden presentar estructuras muy similares incluso cuando sus secuencias han divergido más allá de reconocimiento.

En la práctica, se puede pegar una secuencia desconocida en el software (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) en formato FASTA. Habiendo hecho esto, se puede lanzar la búsqueda. El resultado de la búsqueda mostrará un listado de secuencias con estructuras 3D conocidas. Para confirmar que la secuencia desconocida es de hecho una xilanasa GH10, se pueden encontrar las xilanasas GH10 dentro de la lista de homólogos que tienen una probabilidad de > 90. No todas las proteínas identificadas como homólogas serán caracterizadas como xilanasas GH10, pero algunas sí. Estas últimas proteínas son proteínas con una estructura conocida y una caracterización bioquímica que las identifica como xilanasas. Las primeras no han sido caracterizadas bioquímicamente como xilanasas GH10. Varias referencias describen este protocolo, tal como Söding J. (2005) “Protein homology detection by HMM-HMM comparison” - Bioinformatics 21, 951-960 (doi:10.1093/bioinformatics/bti125) y Söding J, Biegert A, y Lupas AN. (2005) “The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction” - Nucleic Acids Research 33, W244-W248 (Web Server issue) (doi:10.1093/nar/gki40).

De acuerdo a la web Cazy (<http://www.cazy.org/>), las glicosido hidrolasas de familia 10 pueden caracterizarse como se indica a continuación:

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

30 Mecanismo: retención

Clan: GH-A

Nucleófilo/Base catalítica: Glu (experimental)

Donante de protón catalítico: Glu (experimental)

Estatus de estructura 3D: (β/α)₈

35 La xilanasa GH10 de la presente invención puede tener un dominio catalítico con pesos moleculares en el rango de 32-39 kDa. La estructura del dominio catalítico de la xilanasa GH10 de la presente invención consiste en un barril (β/α) de óctuplo (Harris et al 1996 - Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

Las estructuras tri-dimensionales están disponibles para un número elevado de enzimas de familia GH10, siendo las primeras resultas las de xilanasa A de *Streptomyces lividans* (Derewenda et al J Biol Chem 1994, 19 Ago; 269(33) 20811-4), la endo-glicanasa de *C. fimi* Cex (White et al Biochemistry 1994 25 Oct; 33 (42) 12546-52), y la Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (previamente xilanasa A de *Pseudomonas fluorescens* subsp.) (Harris et al Structure 1994, 15 Nov; 2 (11) 1107-16.). Como miembros del clan GHA presentan un clásico plegamiento de barril (α/β)₈ TIM con dos centros activos clave de ácido glutámico localizados en los extremos C-terminales de las cadenas beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat et al Proc Natl Acad Sci U S A 1995, 18 Jul; 92 (15) 7090-4).

45 El término “xilanasa GH10” tal como se usa en la presente memoria significa un polipéptido que presenta actividad de xilanasa y que tiene un plegamiento de barril (α/β)₈ TIM con dos centros activos clave de ácido glutámico localizados en los extremos C-terminales de las cadenas beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo).

En una realización, la xilanasa sintética según la presente invención es capaz de degradar (o degrada) un material que contiene xilano, particularmente arabinoxilanos, particularmente arabinoxilanos insolubles (AXinsol).

50 El término “que consiste esencialmente en” tal como se usa en la presente memoria significa que puede haber presentes componentes no especificados si las características de la composición reivindicada no se ven materialmente afectadas por ello.

El término “que consiste en” significa que las proporciones de los ingredientes especificados deben sumar 100%.

El término “que comprende” usado en la presente memoria puede verse matizado en algunas realizaciones para referirse a que consiste esencialmente en o que consiste en (teniendo ambos un significado más limitado que “que comprende”).

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

- 5 El término “fragmento del mismo” tal como se usa en la presente memoria significa un fragmento activo. En otras palabras, el fragmento es uno que presenta actividad de xilanasa. De forma adecuada, el fragmento puede presentar la misma actividad de xilanasa que la enzima de xilanasa sintética de longitud completa de la cual deriva el fragmento. Alternativamente, el fragmento puede presentar una actividad modificada (por ejemplo, una mayor especificidad, una actividad específica, un perfil específico de pH o temperatura) en comparación con la xilanasa sintética a la cual pertenece el fragmento.
- 10

El fragmento es al menos el 60% de la longitud completa de la xilanasa sintética de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos el 75% de la longitud completa de la xilanasa sintética de la cual deriva el fragmento.

- 15 En una realización, el fragmento es al menos el 85% de la longitud completa de la xilanasa sintética de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos el 95% de la longitud completa de la xilanasa sintética de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos el 98% de la longitud completa de la xilanasa sintética de la cual deriva el fragmento.

- 20 En la presente memoria, el fragmento es un fragmento de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No: 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11.

- 25 En la presente memoria se describe que la xilanasa sintética según la presente invención a) comprende una de las secuencias de aminoácido mostradas en la presente memoria como SEQ ID No. 1, SEQ ID No: 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 11, o b) comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos el 96%, preferiblemente en al menos el 98,5%, preferiblemente en al menos el 99%, a las secuencias de aminoácido mostradas en la presente memoria como SEQ ID No. 1, SEQ ID No: 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 11, o c) comprende un fragmento que es al menos el 85% de la longitud completa de la xilanasa sintética mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 1, SEQ ID No: 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 11.

30 Usos

La xilanasa sintética de la presente invención puede usarse de forma adecuada en una cualquiera de las siguientes aplicaciones:

- a) Un aditivo de piensos para animales; y/o
- b) Un suplemento de pienso para un animal; y/o
- 35 c) Descomposición de material basado en grano (por ejemplo, éste puede ser el grano entero o una parte del grano). Los productos de descomposición (por ejemplo, glucosa) se pueden usar como materia prima para cualquier proceso de fermentación, tal como la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) o la producción de otros productos tales como los bioproductos (por ejemplo, un isopreno de base bio). Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere a la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) y a la utilización mejorada de material
- 40 basado en grano en la industria de los biocombustibles; y/o
- d) Industria de separación de gluten de cereal (por ejemplo, trigo) – almidón. El(los) producto(s) resultante(s) puede(n) ser almidón (por ejemplo, almidón purificado) y/o gluten y/o fibras y/o productos solubles en agua (tales como pentosanos solubles). En una realización, la presente invención se refiere a la producción de almidón y/o gluten; y/o
- e) Mejora del malteado y la elaboración de cerveza, por ejemplo, a través de la descomposición de materiales basados en grano (por ejemplo, cebada malteada) y/o
- 45 f) Para degradar AXsol o los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que no aumenta la viscosidad y/o que la viscosidad se reduce en la mezcla de reacción; y/o
- g) Para reducir la viscosidad cuando se degradan materiales basados en grano, por ejemplo, en procesos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

En la presente memoria se describe que la xilanasa sintética de la presente invención se usa en un pienso. Preferiblemente un pienso que comprende maíz o que es un pienso basado en maíz.

En la presente memoria se describe que la xilanasa sintética de la presente invención se usa en el malteado o en la elaboración de cerveza.

- 5 En la presente memoria se describe que la xilanasa sintética de la presente invención se usa en la separación de gluten de trigo-almidón.

En la presente memoria se describe que la xilanasa sintética de la presente invención se usa en la descomposición de material basado en grano y puede ser parte del proceso de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

Ventajas

- 10 La nueva xilanasa sintética incluida en la presente memoria tiene muchas ventajas en comparación con las xilanasas conocidas.

Adicionalmente, la xilanasa sintética de la presente invención es particularmente termoestable. Esto proporciona ventajas significativas en algunas aplicaciones. En particular, en aplicaciones para piensos, las enzimas se pueden someter a un tratamiento térmico, por ejemplo, durante procesos de peletizado. Por tanto, es necesario que las enzimas sean capaces de mantener su actividad después de dicho procesamiento. La xilanasa sintética de la presente invención es particular e inesperadamente termoestable. Específicamente, se ha observado que la xilanasa sintética de la presente invención presenta una recuperación muy alta (por ejemplo, actividad residual) después del proceso de peletizado.

- 20 De forma adecuada, la xilanasa sintética tiene un valor de T_m superior a 65°C, donde el valor de T_m es la temperatura a la cual se obtiene el 50% de actividad residual tras 10 min de incubación.

Además, una termoestabilidad mejorada también es muy beneficiosa durante la degradación de almidón, que tiene lugar a temperaturas elevadas durante la licuefacción (alrededor de 85-95°C). Al ser termoestables, esto permite la adición de las enzimas durante esta etapa.

- 25 Adicional o alternativamente, se ha descubierto que las xilanasas sintéticas son, de forma inesperada, altamente resistentes a pepsina.

La pepsina es una proteasa digestiva excretada por un animal en la primera parte del sistema digestivo. La pepsina degrada proteínas, lo que hace que las proteínas estén disponibles como nutrientes para el animal. Las enzimas exógenas, es decir, las enzimas añadidas al pienso, también son proteínas y se degradarán si son susceptibles de degradación por acción de la pepsina. En la mayoría de los casos esto destruirá la actividad enzimática. Por tanto, es altamente ventajoso que las xilanasas sintéticas presente resistencia a pepsina.

- 30 La xilanasa sintética incluida en la presente memoria, de la presente invención, también es inesperadamente buena solubilizando pentosanos.

La xilanasa sintética incluida en la presente memoria, de la presente invención, es inesperadamente buena solubilizando AXinsol.

- 35 De forma sorprendente, se ha descubierto que la xilanasa sintética de la presente invención es particularmente buena para degradar materiales que contienen xilano, tal como arabinoxilanos, por ejemplo, AXinsol, en un amplio espectro de sustratos, maíz, trigo, DDGS, etc., en particular sustratos de maíz y basados en maíz, en particular tanto productos de trigo (que incluyen productos basados en trigo) como maíz (que incluye productos basados en maíz). Esto contrasta con las enzimas de la técnica anterior, que a menudo son inferiores para solubilizar AXinsol en maíz o sustratos basados en maíz, o que no son eficientes en sustratos basados en trigo y maíz.

Adicionalmente, la xilanasa sintética de la presente invención puede ser particularmente buena no solo para descomponer (solubilizar) AXinsol, sino también para descomponer (o degradar) los polímeros solubilizados de forma eficiente. Al ser capaces de descomponer (degradar) eficientemente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos al disolver AXinsol), se obtiene una reducción de la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

- 45 Típicamente, las xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, pero conducirán a un aumento de productos de polimerización, lo que conducirá a un aumento de la viscosidad de la mezcla. Dicho aumento de la viscosidad es desventajoso en muchas aplicaciones.

Se ha descubierto que la xilanasa sintética de la presente invención, y tal como se describe en la presente memoria, no solo descompone (solubiliza) los arabinoxilanos insolubles (AXinsol) en un amplio abanico de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., en particular sustratos de maíz y basados en maíz, en particular productos de trigo (que incluyen basados en trigo) y de maíz (que incluyen productos basados en maíz), sino que también descompone

eficientemente los polímeros así solubilizados para asegurar que la viscosidad no se eleva y/o para reducir la viscosidad.

5 En algunas realizaciones, las xilanasas sintéticas de la presente invención y tal como se describen en la presente memoria son capaces de degradar AXsol o los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no aumenta y/o que la viscosidad se reduce en la mezcla de reacción.

En particular, la xilanasas sintética de la presente invención es particularmente efectiva para degradar materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, por ejemplo AXinsol, en sustratos de maíz y basados en maíz.

10 Muchas de las xilanasas comercializadas para uso en piensos para solubilizar pentosanos son enzimas GH11. Se había considerado, por parte de los especialistas en la técnica, que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes a la hora de solubilizar pentosanos, particularmente AXinsol, como las xilanasas GH11. De forma sorprendente se ha descubierto que la(s) xilanasas(s) sintética(s) descrita(s) en la presente memoria que son xilanasas GH10 son particularmente buenas para solubilizar AXinsol en un amplio espectro de sustratos, que incluyen sustratos basados en maíz. De forma sorprendente, los presentes inventores han descubierto que las xilanasas sintéticas de la presente invención (e incluidas en la presente memoria) superan a las xilanasas GH11 comerciales en su capacidad para solubilizar pentosanos.

El hecho de que las xilanasas sintéticas solubilizan de forma eficiente AXinsol procedente de maíz y sustratos basados en maíz, es significativamente ventajoso ya que el maíz contiene muchos más AX en forma insoluble que otros cereales, tal como el trigo y el centeno, por ejemplo. Por lo tanto, solo las xilanasas que pueden descomponer AXinsol pueden mostrar un beneficio significativo para animales alimentados con una dieta de maíz-soja, por ejemplo.

20 Fue completamente inesperado que una xilanasas GH10 fuera tan buena solubilizando AXinsol en cereales, particularmente en maíz o sustratos basados en maíz.

25 La xilanasas sintética de la presente invención es capaz de degradar eficientemente (y rápidamente) los polímeros y/u oligómeros que son producidos en la solubilización de AXinsol o que están presentes en materiales basados en grano. Esto conduce a una ventaja inesperada para la xilanasas sintética incluida en la presente memoria, ya que es particularmente buena en una serie de aplicaciones para mantener la viscosidad baja o para reducir la viscosidad, por ejemplo, en piensos; en la elaboración de cerveza y/o el malteado; en la producción basada en grano de glucosa, por ejemplo, para un procesado adicional a biocombustibles y/o bioproductos (por ejemplo, isopreno de base bio); o en la industria de separación de gluten de trigo-almidón para la producción de almidón, por ejemplo.

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

30 La enzima de la presente invención es particularmente efectiva para potenciar la actuación de un sujeto o para mejorar la digestibilidad de una materia prima en un pienso y/o para mejorar la eficiencia del pienso en un sujeto.

Material que contiene xilano

La xilanasas sintética de la presente invención (o la composición que comprende la xilanasas sintética de la presente invención) puede usarse para degradar cualquier material que contiene xilano.

35 En una realización, el material que contiene xilano es cualquier material vegetal que comprende arabinoxilano.

En una realización, 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 componente para pienso.

40 En una realización, el material que contiene xilano es un material basado en grano (que incluye granos enteros o granos parciales o granos malteados, por ejemplo, cebada malteada). Cuando el método se refiere a la producción de biocombustible (por ejemplo, producción de bioetanol) entonces preferiblemente el material que contiene xilano es un material basado en grano.

En otra realización, el material que contiene xilano puede ser malta o pulpa de cebada, o cebada malteada o combinaciones de las mismas.

45 En otra realización adicional, el material que contiene xilano puede ser una harina de cereal (por ejemplo, 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 (por ejemplo, harina de trigo, avena, centeno o cebada).

Descomposición o degradación

50 La enzima (o la composición que comprende la enzima) de la presente invención, o tal como se describe en la presente memoria, puede usarse para descomponer (degradar) AXinsol o AXsol o los productos de degradación de AXinsol.

El término “descomponer” o “degradar” es sinónimo de hidrolizar.

Solubilización/degradación

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

Este método puede describirse aquí como solubilización de pentosanos o solubilización de arabinoxilanos o solubilización de AXinsol o degradación de AXinsol.

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

En una realización adicional de la presente invención, el método se refiere a degradar (por ejemplo, descomponer) polímeros derivados de la degradación de arabinoxilanos insolubles.

Arabinoxilano (AX)

15 El término “arabinoxilanos” (AX) tal como se usa en la presente memoria significa un polisacárido que consiste en una cadena principal de xilano (unidades de xilosa unidas vía enlaces 1,4) con L-arabinofuranosa (L-arabinosa en su forma de anillo de 5 átomos) unida aleatoriamente mediante enlaces $1\alpha\rightarrow 2$ y/o $1\alpha\rightarrow 3$ a las unidades de xilosa a lo largo de la cadena. El arabinoxilano es una hemicelulosa que se encuentra en las paredes celulares primarias y secundarias de las plantas. El arabinoxilano se puede encontrar en el salvado de granos tales como el trigo, maíz, centeno y cebada.

20 El arabinoxilano (AX) se encuentra en estrecha asociación con la pared de la célula vegetal, donde actúa como pegamento que une las diversas unidades de construcción de la pared celular vegetal y el tejido vegetal, proporcionando tanto fortaleza estructural como rigidez.

El término “pentosano” tal como se usa en la presente memoria es cualquiera de un grupo de carbohidratos que da lugar a pentosas tras una hidrólisis completa.

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

AX es la principal fracción de Polisacárido No Almidón (NSP) en varias de las materias primas para piensos más importantes, incluyendo el trigo y el maíz.

30 Su abundancia, su ubicación dentro de la materia vegetal y su estructura molecular hacen que el AX tenga un impacto grave negativo sobre la digestibilidad del pienso, reduciendo de forma efectiva el valor nutricional de las materias primas en las que se haya presente. Esto hace que el AX sea un factor anti-nutricional importante, reduciendo la eficiencia de la producción animal.

35 Adicionalmente, el AX puede tener un impacto negativo grave cuando se pretende descomponer la materia vegetal, por ejemplo, en procesos tales como elaboración de cerveza, malteado, fabricación de biocombustible, reduciendo de forma efectiva la cantidad de sustrato accesible de la materia prima vegetal.

Los AXs también pueden contener cantidades sustanciales de agua (lo que puede denominarse capacidad de retención de agua) – esto puede hacer que los arabinoxilanos solubles presenten una (elevada) viscosidad – lo cual es una desventaja en muchas aplicaciones.

40 El término “Hemicelulosa” – tal como se usa en la presente memoria indica los componentes de tipo polisacárido de las paredes celulares vegetales que no son celulosa. El término “hemicelulosa” tal como se usa en la presente memoria puede significar polisacáridos de las paredes celulares vegetales que son extraíbles mediante disoluciones alcalinas diluidas. Las hemicelulosas comprenden constituyen casi un tercio de los carbohidratos del tejido de plantas leñosas. La estructura química de las hemicelulosas consiste en cadenas largas de una variedad de pentosas, hexosas, y sus correspondientes ácidos urónicos. Las hemicelulosas pueden encontrarse en la fruta, tallos de plantas, y cáscaras de granos. El xilano es un ejemplo de 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 en agua (WU-AX) constituye una proporción significativa de la materia seca de la materia vegetal.

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

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

En el maíz, AXinsol puede suponer el 3,5-6% (por ejemplo, 5,1%) de la materia seca. En el DDGS de maíz, AXinsol puede suponer el 10-20% (por ejemplo, 12,6%) de la materia seca.

5 AXinsol produce atrapamiento de nutrientes en los piensos. Cantidades grandes de nutrientes fácilmente digeribles, tal como almidón y proteínas, permanecen en agrupamientos de material de la pared celular o ligados a cadenas laterales de AX. Dichos nutrientes atrapados no estarán disponibles para la digestión y posterior absorción en el intestino delgado.

Arabinosilano soluble en agua (AXsol)

10 El arabinosilano soluble en agua (AXsol), también conocido como arabinosilano extraíble en agua (WE-AX), puede dar lugar a problemas en la producción de biocombustible, la producción de bioproductos, el procesado de carbohidratos y/o el malteado y/o la elaboración de cerveza y/o en piensos, ya que puede producir un incremento de la viscosidad debido a la capacidad de unión a agua del AXsol.

15 En los piensos, el AXsol puede presentar un efecto anti-nutricional particularmente en monogástricos, ya que producen un aumento considerable de la viscosidad del contenido intestinal, producido por la extraordinaria capacidad de captación de agua del AXsol. El aumento de viscosidad puede afectar a la digestión del pienso y al uso de nutrientes, ya que puede impedir un mezclamiento apropiado del pienso con las enzimas digestivas y las sales biliares, y/o reduce la disponibilidad y la absorción de nutrientes y/o estimula la fermentación en el intestino posterior.

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

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

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

En el maíz, el AXsol puede suponer el 0,1-0,4% (por ejemplo, 0,1%) de la materia seca. En el DDGS de maíz, el AXinsol puede suponer el 0,3-2,5% (por ejemplo, 0,4%) de la materia seca.

25 Adicionalmente, sin embargo, a la cantidad de AXsol presente en el material vegetal, cuando una xilanasolubiliza el AXinsol de un material vegetal, éste puede liberar pentosanos y/u oligómeros que contribuyen al contenido de AXsol del material vegetal.

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

30 Una descomposición de AXsol puede reducir la viscosidad.

Una descomposición de AXsol puede liberar nutrientes.

Viscosidad

La presente invención puede usarse para asegurar que la viscosidad no aumenta y/o para reducir la viscosidad en cualquier proceso en el que la capacidad de unión a agua del AXsol produce un aumento indeseado de la viscosidad.

35 La presente invención se refiere a asegurar que la viscosidad no aumenta y/o para reducir la viscosidad descomponiendo (degradando) el AXsol o descomponiendo (degradando) los polímeros y/o los oligómeros producidos al solubilizar AXinsol.

40 Sin pretender establecer ninguna teoría, al ser capaz de descomponer (degradar) eficientemente (rápidamente) los polímeros solubilizados (por ejemplo, oligómeros) obtenidos al disolver AXinsol, se puede evitar un aumento no deseado de la viscosidad y/o se puede obtener una reducción de la viscosidad. El término "eficientemente" tal como se usa en la presente memoria significa que la enzima es capaz de degradar los polímeros (por ejemplo, oligómeros) que se están formando en la solubilización del AXinsol con mayor rapidez que lo que se degrada (o se solubiliza) el AXinsol.

La reducción de la viscosidad presenta ventajas en muchas aplicaciones, como se indica en la presente memoria.

45 Un ejemplo de una xilanasol utilizada en la industria del bioetanol es Xylathin™.

Un ejemplo de una xilanasol utilizada en la industria de separación de gluten de trigo-almidón es Shearzyme™.

En una realización de la presente invención, las xilanasas incluidas en la presente invención son reductoras de la viscosidad.

- Generalmente, el trigo (u otro cereal) en primer lugar es molido en seco para separar el salvado y el germen del endospermo, que se molido para formar una harina. Dicha harina de endospermo es fraccionada a continuación mediante un proceso de separación de almidón de trigo, dando lugar a varias corrientes de producto de valor comercial variable. El principal objetivo es producir un grado refinado de almidón-A, que consiste en gránulos grandes lenticulares de 15-40 µm. La segunda corriente 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 conforma el material de partida para la producción de almidón modificado, con aplicaciones tanto en alimentación como ajenas a la alimentación. El gluten vital es el tercer producto de valor añadido de los procesos de separación del trigo. La vitalidad del gluten de trigo aislado se determina a través de la capacidad para formar entramados viscoelásticos, requeridos en la fabricación de pan. El gluten vital encapsula el dióxido de carbono formado en la preparación de la masa durante la cocción, y por tanto 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, a menudo se usa para enriquecer harinas en la fabricación de pan, para alcanzar productos de pan mejorados. Otros mercados para el gluten incluyen como aditivo en productos vegetarianos, de carne, pescado o ave de corral; en desayunos de cereales; o en la salsa de soja. Debido a su termoplasticidad y buenas propiedades formadoras de película, el gluten se usa también en mercados no alimentarios como adhesivos. (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey, C.W Wrigley, Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 82-90, "Wheat-gluten uses and industry needs").
- Las xilanasas sintéticas incluidas en la presente memoria pueden usarse para reducir la viscosidad (o para no aumentar la viscosidad) en procesos para separar harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo, avena, centeno o cebada) en fracciones de almidón y gluten y para mejorar la separación a través de la degradación de oligosacáridos que dificultan la aglomeración de gluten.
- La viscosidad del mosto, y la viscosidad de la pulpa de cebada y la malta de cebada en la elaboración de cerveza y el malteado puede producir desventajas significativas durante la elaboración de la cerveza y/o el malteado. La presente invención se refiere a reducir la viscosidad (o a no aumentar la viscosidad) del mosto, la pulpa de cebada, la malta de cebada o una combinación de los mismos.
- Pienso o componente para piensos
- La xilanasas sintética o la composición de aditivo para pienso de la presente invención puede usarse como un pienso, o en la preparación de un pienso.
- El término "pienso" se usa en la presente memoria como sinónimo de "componente para pienso".
- Preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano de la presente invención es un componente para pienso, o un constituyente de un componente para pienso, o un pienso.
- El pienso puede estar en la forma de una disolución o como un sólido o un semi-sólido, dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o del modo de administración.
- Cuando se usa como pienso, o en la preparación de un pienso, tal como un pienso funcional, la enzima o la composición de la presente invención pueden usarse en combinación con uno o más de: un vehículo nutricionalmente aceptable, un diluyente nutricionalmente aceptable, un excipiente nutricionalmente aceptable, un adyuvante nutricionalmente aceptable, un ingrediente nutricionalmente activo.
- En una realización preferida, la enzima o la composición de aditivo para pienso de la presente invención se mezcla con un componente de pienso para conformar un pienso.
- El término "componente para pienso" tal como se usa en la presente memoria significa una parte o la totalidad del pienso. La parte del pienso puede indicar un constituyente del pienso o más de un constituyente del pienso, por ejemplo, 2 o 3 o 4. En una realización, el término "componente para pienso" abarca una premezcla o constituyentes de premezcla.
- Preferiblemente, el pienso puede ser un forraje, una premezcla del mismo, un pienso de compuesto, o una premezcla del mismo. En una realización, la composición de aditivo para piensos según la presente invención puede mezclarse con un pienso de compuesto, un compuesto de componente para pienso o una premezcla de un compuesto de pienso o un forraje, un componente de forraje, o una premezcla de un forraje.
- El término "forraje" tal como se usa en la presente memoria significa cualquier alimento que se proporciona a un animal (en contraposición a que el animal consiga por sí mismo el forraje). Forraje abarca plantas que han sido cortadas.
- El término forraje incluye ensilaje, piensos comprimidos y peletizados, aceites y raciones mixtas, y también granos y legumbres con brotes.

El forraje se puede obtener de una o más plantas seleccionadas entre: maíz, alfalfa, cebada, trébol de pie de ave, brassicas, Chau moellier, col rizada, colza (canola), colinabo (nabo sueco), nabo, trébol, trébol alsike, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco, festuca, bromo, mijo, avena, sorgo, soja, árboles (cortes de árboles podados para heno de árbol), trigo y legumbres.

- 5 El término “compuesto de pienso” significa un pienso comercial en la forma de harina, pelet, frutos secos, torta o desmenuzado. Los compuestos de pienso pueden mezclarse a partir de varias materias primas y aditivos. Dichas mezclas se formulan según los requisitos específicos del animal objetivo.

Los compuestos de pienso pueden ser piensos 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, tal como minerales y vitaminas.

10

Los principales ingredientes usados en los compuestos de pienso son los granos para pienso, que incluyen maíz, trigo, harina de canola, harina de colza, lupinus, soja, sorgo, avena y cebada.

De forma adecuada, una premezcla como las indicadas en la presente memoria puede ser una composición constituida por microingredientes tales como vitaminas, minerales, conservantes químicos, antibióticos, productos de fermentación, y otros ingredientes esenciales. Las premezclas habitualmente son composiciones adecuadas para mezcla en raciones comerciales.

15

Cualquier pienso de la presente invención puede comprender uno o más materiales de pienso seleccionados del grupo que comprende a) cereales, tal como granos pequeños (por ejemplo, trigo, cebada, centeno, avena, triticale y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes tales como maíz o sorgo; b) subproductos de cereales, tales como

20 harina de gluten de maíz, torta húmeda (particularmente torta húmeda basada en maíz), Grano Seco de Destilados (DDG) (particularmente Grano Seco de Destilados basado en maíz (cDDG)), Solubles de Grano Seco de Destilados (DDGS) (particularmente Solubles de Grano Seco de Destilados de maíz (cDDGS)), salvado de trigo, centros de trigo, cortos de trigo, salvado de arroz, cáscara de arroz, cáscara de avena, semilla de palma, y pulpa de cítricos; c) proteínas obtenidas de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, lupinus, habas, algodón, canola, harina de pescado, proteína de plasma en seco, harina cárnica y de hueso, proteína de patata, suero, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidos de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.

25

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

En una realización, el componente de pienso puede ser maíz, DDGS (por ejemplo, cDDGS), trigo, salvado de trigo o una combinación de los mismos.

30

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

En una realización, el componente de pienso puede ser maíz, DDGS (tal como cDDGS) o una combinación de los mismos.

35 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 maíz y harina de soja o de maíz y soja con su grasa, o harina de trigo o harina de girasol.

Un pienso de la presente invención puede contener entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40% de DDGS de maíz. Para aves de corral, el pienso de media puede contener entre aproximadamente 7 y 15% de DDGS de maíz. Para ganado porcino (cerdos), el pienso puede contener de media entre 5 y 40% de DDGS de maíz.

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

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

Adicional o alternativamente, un pienso de la presente invención puede comprender al menos un material de pienso de alto contenido en fibra y/o al menos un subproducto de al menos un material de pienso de alto contenido en fibra para proporcionar un pienso con un alto contenido en fibra. Los ejemplos de materiales para pienso con alto contenido en fibra incluyen: trigo, cebada, centeno, avena, subproductos de cereales, tal como harina de gluten de maíz, pienso de gluten de maíz, torta húmeda, Grano Seco de Destilados (DDG), Solubles de Grano Seco de Destilados (DDGS), salvado de trigo, medios de trigo, cortos de trigo, salvado de arroz, cáscara de arroz, cáscara de avena, semilla de palma, y pulpa de cítricos. También se pueden considerar algunas proteínas de alto contenido en fibra: proteínas obtenidas de fuentes tales como girasol, lupinus, habas y algodón.

45

50

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 de alto contenido en fibra seleccionado del grupo que consiste en

Solubles de Grano Seco de Destilados (DDGS), particularmente cDDGS, torta húmeda, Grano Seco de Destilados (DDG), particularmente cDDG, salvado de trigo, y trigo, por ejemplo.

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

10 En la presente invención, el pienso puede ser uno o más de los siguientes: un compuesto de pienso y premezcla, que incluye pelets, frutos secos o torta (de ganado); un cultivo o residuo de cultivo: maíz, soja, sorgo, avena, cebada, copra, paja, cascarilla, residuo de remolacha; harina de pescado; harina de carne y hueso; melaza; torta de aceite y torta de prensa; oligosacáridos; plantas de forraje conservadas: ensilaje, algas, semillas y granos, tanto enteros como preparados por aplastamiento, moliendas, etc.; granos y legumbres con brotes; extracto de levadura.

15 El término "pienso" en la presente invención abarca en algunas realizaciones pienso para mascotas. Un pienso para mascotas es un material vegetal o animal destinado a consumo por parte de mascotas, tal como comida para perros o comida para gatos. Los piensos para mascotas, tal como comida para perros y comida para gatos, pueden ser en forma seca, como alimentos equilibrados para perros, o en forma húmeda enlatada. La comida para gatos puede contener el aminoácido taurina.

20 El término "pienso" en la presente invención abarca en algunas realizaciones comida para peces. Una comida para peces normalmente contiene macronutrientes, elementos traza y vitaminas, necesarios para mantener a los peces cautivos con una buena salud. La comida para peces puede ser en la forma de copos, pelets o comprimidos. Las formas pelletizadas, algunas de las cuales se hunden rápidamente, a menudo se usan para peces más grandes o para especies que se alimentan en el fondo. Algunas comidas para peces también contienen aditivos, tal como beta caroteno u hormonas sexuales, para potenciar artificialmente el color de peces ornamentales.

El término "pienso" en la presente invención abarca en algunas realizaciones comida para aves. La comida para aves incluye comida que se usa tanto en comederos para aves como para alimentar aves mascota. Típicamente, la comida para aves comprende una variedad de semillas, pero también puede abarcar sebo (de vaca o de carnero).

25 Tal como se usa en la presente memoria, el término "en contacto" se refiere a la aplicación indirecta o directa de la enzima (o de la composición que comprende la enzima) de la presente invención al producto (por ejemplo, el pienso). Los ejemplos de los métodos de aplicación que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, tratar el producto en un material que comprende la composición de aditivo para pienso, la aplicación directa mediante mezclado de la composición de aditivo para pienso con el producto, la pulverización de la composición de aditivo para pienso sobre la superficie del producto o la inmersión en una preparación de la composición de aditivo para pienso.

30 En una realización, la composición de aditivo para pienso de la presente invención preferiblemente se mezcla con el producto (por ejemplo, pienso). Alternativamente, la composición de aditivo para pienso puede incluirse en la emulsión o en los ingredientes de partida de un pienso.

35 Para algunas aplicaciones, es importante que la composición se haga disponible para la superficie de un producto que va a verse afectado/tratado. Esto permite que la composición confiera una o más de las siguientes características favorables: beneficios de prestaciones.

La xilanasa sintética (o la composición que comprende la xilanasa sintética) de la presente invención puede aplicarse para entremezclarse, recubrir y/o impregnar un producto (por ejemplo, pienso o ingredientes de un pienso) con una cantidad controlada de dicha enzima.

40 En una realización particularmente preferida, la enzima (o la composición que comprende la enzima) de la presente invención se homogeniza para producir un polvo.

En una realización alternativa preferida, la enzima (o la composición que comprende la enzima) de la presente invención se formula en gránulos como se describe en el documento WO2007/044968 (referidos como gránulos TPT) o WO1997/016076 o WO1992/012645.

45 En otra realización preferida, cuando la composición de aditivo para pienso se formula en gránulos, los gránulos comprenden una barrera salina hidratada alrededor del núcleo proteico. La ventaja de dicho recubrimiento salino es una mejor tolerancia térmica, una mejor estabilidad durante almacenamiento y protección frente a otros aditivos, que de otro modo tendrían efectos adversos sobre la enzima.

50 Preferiblemente, la sal usada para el recubrimiento salino presenta una actividad en agua superior a 0,25 o una humedad constante superior a 60% a 20°C.

Preferiblemente, el recubrimiento salino comprende 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 pelletizar el polvo. El polvo puede mezclarse con otros componentes

conocidos en la técnica. El polvo, o la mezcla que comprende el polvo, puede forzarse a través de un troquel y las hebras resultantes se cortan en pelets adecuados de longitud variable.

5 Opcionalmente, la etapa de peletización puede incluir un tratamiento con vapor, o etapa de acondicionamiento, antes de la formación de los pelets. La mezcla que comprende el polvo puede colocarse en un acondicionador, por ejemplo, un mezclador con inyección de vapor. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura especificada, tal como 60-100°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. Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minutos, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

10 Cabe destacar que la enzima (o la composición que comprende la enzima) de la presente invención es adecuada para adición a cualquier material de pienso apropiado.

El especialista en la técnica entenderá que animales diferentes requieren piensos diferentes, e incluso el mismo animal puede requerir piensos diferentes, dependiendo del propósito para el cual es criado.

Opcionalmente, el pienso también puede contener minerales adicionales tales como, por ejemplo, calcio y/o vitaminas adicionales.

15 Preferiblemente, el pienso es una mezcla de harina de soja y maíz.

En una realización, el pienso preferiblemente no es comida para mascotas.

20 En la presente memoria se describe un método para producir un pienso. El pienso se produce típicamente en molinos de pienso en los que las materias primas son molidas primero hasta un tamaño de partícula adecuado y a continuación se mezclan con los aditivos apropiados. El pienso puede ser producido entonces como una pulpa o como pelets; estos últimos típicamente implican un método mediante el cual la temperatura es elevada hasta un valor objetivo y a continuación se hace pasar el pienso a través de un troquel para producir pelets de un tamaño concreto. Se deja que los pelets se enfríen. Posteriormente, se pueden añadir aditivos líquidos, tal como grasas o enzimas. La producción de piensos también puede implicar una etapa adicional que incluye la extrusión o la expansión antes del peletizado – en particular mediante técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor.

25 El pienso puede ser un pienso para un animal monogástrico, tal como aves de corral (por ejemplo, pollos destinados a la producción de carne, gallinas ponedoras, pollos reproductores, pavos, patos, gansos, aves acuáticas), y porcinos (todas las categorías de edad), un rumiante tal como vacuno (por ejemplo, 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 el salmón, bacalao, trucha y carpa, por ejemplo, carpa koi, peces marinos como la lubina, y crustáceos como las gambas, los mejillones y las vieiras). Preferiblemente, el pienso es para aves de corral.

30 Pienso basado en maíz

En una realización preferida, el pienso puede ser un pienso basado en maíz. El término “pienso basado en maíz” tal como se usa en la presente memoria significa un pienso que comprende o que consiste en maíz o un sub-producto de maíz.

35 Preferiblemente, el pienso basado en maíz comprende maíz o un sub-producto de maíz como constituyente principal. Por ejemplo, el pienso basado en maíz puede comprender al menos 35% de maíz o un sub-producto de maíz, tal como al menos 40% de maíz o un sub-producto de maíz, tal como al menos 50% de maíz o un sub-producto de maíz, tal como al menos 60% de maíz o un sub-producto de maíz, tal como al menos 70% de maíz o un sub-producto de maíz, tal como al menos 80% de maíz o un sub-producto de maíz, tal como al menos 90% de maíz o un sub-producto de maíz, por ejemplo 100% de maíz o un sub-producto de maíz.

40 En algunas realizaciones, el pienso basado en maíz puede comprender maíz o un sub-producto de maíz como constituyente minoritario; en cuyo caso el pienso puede estar suplementado con maíz o un sub-producto de maíz. Meramente a modo de ejemplo, el pienso puede comprender por ejemplo trigo suplementado con maíz o un sub-producto de maíz.

45 Cuando el maíz o el sub-producto de maíz es un constituyente minoritario del pienso, el maíz o sub-producto de maíz está en el pienso en al menos un 5%, preferiblemente al menos un 10%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 30%.

Para evitar dudas, el término “maíz” tal como se usa en la presente memoria es sinónimo de *Zea mays*.

50 En una realización, el sub-producto de maíz puede ser Solubles de Grano Seco de Destilados de maíz (cDDGS) o torta húmeda de maíz o Grano Seco de Destilados de maíz (cDDG) o harina de gluten de maíz o pienso de gluten de maíz, o combinaciones de los mismos.

En una realización, preferiblemente el material que contiene arabinoxilano de la presente invención comprenden un sub-producto de maíz, tal como Solubles de Grano Seco de Destilados (cDDGS) o torta húmeda de maíz o Grano Seco de Destilados (DDG) o harina de gluten de maíz o pienso de gluten de maíz, o combinaciones de los mismos.

Pienso basado en trigo

- 5 En una realización preferida, el pienso puede ser un pienso basado en trigo. El término “pienso basado en trigo” tal como se usa en la presente invención significa un pienso que comprende o que consiste en trigo o un sub-producto de trigo.

Preferiblemente, el pienso basado en trigo comprende trigo o un sub-producto de trigo como constituyente principal. Por ejemplo, el pienso basado en trigo puede comprender al menos 40% de trigo o un sub-producto de trigo, tal como al menos 60% de trigo o un sub-producto de trigo, tal como al menos 80% de trigo o un sub-producto de trigo, tal como al menos 90% de trigo o un sub-producto de trigo, por ejemplo 100% de trigo o un sub-producto de trigo.

En algunas realizaciones, el pienso basado en trigo puede comprender trigo o un sub-producto de trigo como constituyente minoritario; en cuyo caso el pienso puede estar suplementado con trigo o un sub-producto de trigo. Meramente a modo de ejemplo, el pienso puede comprender por ejemplo trigo suplementado con trigo o un sub-producto de trigo.

15 Cuando el trigo o el sub-producto de trigo es un constituyente minoritario del pienso, el trigo o sub-producto de trigo está en el pienso en al menos un 5%, preferiblemente al menos un 10%, preferiblemente al menos un 20%, preferiblemente al menos un 30%.

En una realización, el sub-producto de trigo puede ser salvado de trigo, medias de trigo, fibras de trigo, por ejemplo.

20 El salvado es la capa externa dura del grano y consiste en aleurona y pericarpio combinados. Junto con el germen, es una parte integral de los granos enteros, y a menudo se produce como sub-producto de la molienda en la producción de granos refinados. Cuando se separa el salvado de los granos, los granos pierden una porción de su valor nutricional. El salvado está presente y puede ser molido a partir de cualquier grano de cereal, incluyendo arroz, maíz, 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.

25 Las medias de trigo son las partículas gruesas y finas del salvado de trigo, y las partículas finas de los cortos de trigo, germen de trigo, harina de trigo y los interiores de la “cola del molino”.

30 Las medias de trigo es un sub-producto barato intermedio entre comida humana y pienso animal. En una realización, preferiblemente el material que contiene arabinoxilano de la presente invención comprende salvado de trigo y/o medias de trigo.

Torta húmeda, Granos Secos de Destilados (DDG) y Solubles de Grano Seco de Destilados (DDGS)

La torta húmeda, los Granos Secos de Destilados y los Granos Secos de Destilados con Solubles son productos obtenidos tras retirar el alcohol etílico mediante destilación de la fermentación de levadura de un grano o una mezcla de granos mediante métodos empleados en la industria del destilado de grano.

35 Los posos procedentes de la destilación (por ejemplo, que comprenden agua, restos de grano, células de levadura, etc.) se separan en una parte “sólida” y una parte líquida.

La parte sólida se denomina “torta húmeda” y puede usarse como pienso para animales como tal.

La parte líquida se evapora (parcialmente) para dar lugar a un jarabe (solubles).

Cuando la torta húmeda se seca, constituye los Granos Secos de Destilados (DDG).

40 Cuando la torta húmeda se seca junto con el jarabe (solubles), constituye los Granos Secos de Destilados con Solubles (DDGS).

La torta húmeda puede usarse en operaciones de vaquerías (de leche) y en lotes de pienso para vacuno de carne.

Los DDGS secos pueden usarse en piensos para ganado (por ejemplo, de leche, de carne y porcino) y en piensos para aves de corral.

45 El DDGS de maíz es una fuente de proteínas muy buena para vacas lecheras.

Harina de gluten de maíz

En un aspecto, el sub-producto de maíz puede ser harina de gluten de maíz (CGM).

La CGM es un sub-producto en polvo de la industria de molienda de maíz. La CGM tiene utilidad, por ejemplo, en piensos para animales. Puede usarse como fuente económica de proteínas para piensos tales como comida para mascotas, piensos para ganado y piensos para aves. Es una fuente especialmente buena del aminoácido cisteína, pero debe equilibrarse con otras proteínas en términos de lisina.

5 Composición de aditivo de pienso

La composición de aditivo de pienso de la presente invención y/o el pienso que la comprende pueden usarse en cualquier forma adecuada.

10 La composición de aditivo de pienso de la presente invención puede usarse en la forma de preparaciones sólidas o líquidas o sus alternativas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, pelets, comprimidos, molidos, y gránulos que pueden ser humectables, secados por pulverización o secados por congelación. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, aunque sin limitación, disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuo-orgánicas.

En algunas aplicaciones, las composiciones de aditivo de pienso de la presente invención pueden mezclarse con pienso o administrarse en el agua de bebida.

15 En la presente memoria se describe un método de preparación de una composición de aditivo de pienso, que comprende mezclar una xilanasa como la incluida en la presente memoria con un vehículo, diluyente o excipiente aceptable para pienso, y (opcionalmente) empaquetar.

Premezcla

20 El pienso y/o la composición de aditivo de pienso pueden combinarse con al menos un mineral y/o al menos una vitamina. Las composiciones derivadas de este modo pueden referirse en la presente memoria como un pienso.

Malteado y elaboración de cerveza

La xilanasa sintética (o la composición que comprende la xilanasa sintética) de la presente invención puede usarse en el malteado y en la elaboración de cerveza.

25 Los granos de cebada contienen de 1,7 a 4,1% (p/p) de extraíbles 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 extraíbles en agua y de 0,6 a 1,4% (p/p) de beta-glucano total (Anderson, M.A. et al (1978), ver anterior).

30 La hidrólisis eficiente de arabinoxilanos (AXsol) y de beta-glucano es importante ya que dichos compuestos pueden estar implicados en problemas de producción tales 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 la filtrabilidad y la formación de neblina (Coote, N. & Kirsop, B.H. 1976., Journal of the Institute of Brewing, 1976, 82, 34; Izawa, M., Kano, Y. & Kanimura, M. 1991. Proceedings Aviemore Conference on Malting, brewing and Distilling, 1990, 427).

35 La presente invención proporciona un método para hidrolizar arabinoxilanos (por ejemplo, AXinsol y AXsol) durante el malteado y la elaboración de cerveza, donde los granos de trigo, los granos de cebada o una combinación de los mismos, o porciones de los granos de trigo y/o de cebada, se mezclan con la xilanasa sintética de la presente invención.

40 En la presente memoria se describe una composición alimentaria que es una bebida, que incluye, aunque sin limitación, una bebida fermentada tal como cerveza y vino, que comprende una xilanasa sintética según la presente invención.

En la presente memoria se describe una composición alimentaria que es una bebida, que incluye, aunque sin limitación, una bebida fermentada tal como cerveza y vino, que comprende una xilanasa sintética según la presente invención.

45 En el contexto de la presente invención, el término "bebida fermentada" pretende comprender cualquier bebida producida mediante un método que comprende un proceso de fermentación, tal como una fermentación microbiana, tal como una fermentación bacteriana y/o de levadura.

50 En un aspecto de la invención, la bebida fermentada es cerveza. El término "cerveza" pretende comprender cualquier mosto fermentado producido mediante fermentación/elaboración de una materia vegetal que contiene almidón. A menudo, la cerveza es producida a partir de una malta o adjunto, o de cualquier combinación de malta y adjunto como la materia vegetal que contiene almidón. Tal como se usa en la presente memoria, el término "malta" indica cualquier grano de cereal malteado, tal como cebada malteada o trigo malteado.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término “adjunto” se refiere a cualquier almidón y/o materia vegetal que contiene azúcar que no es malta, tal como malta de cebada o trigo. Como ejemplos de adjuntos, se pueden mencionar materias tales como sémolas de maíz comunes, sémolas de maíz refinadas, levadura molida de elaboración de cerveza, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada sin cáscara, trigo, almidón de trigo, cereal torrado, copos de cereal, centeno, avena, maíz, patata, tapioca, cassava y jarabes, tal como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o trigo, y similares, pueden usarse como fuente de almidón.
- 10 Tal como se usa en la presente memoria, el término “pulpa” (por ejemplo, tal como se usa en la presente memoria en relación al malteado y la elaboración de cerveza) se refiere a una suspensión acuosa de cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, tal como una molienda, por ejemplo, que comprende malta de cebada molida, cebada molida, y/u otro adjunto o una combinación de los mismos, mezclados con agua después para ser separado en mosto y granos agotados.
- 15 Tal como se usa en la presente memoria, el término “mosto” se refiere al licor no fermentado producido tras extraer el polvo molido durante la formación de la pulpa.
- 15 En la presente memoria se describe un método para preparar una bebida fermentada tal como cerveza, que comprende mezclar la xilanasa sintética de la presente invención con malta o adjunto.
- 20 Los ejemplos de cervezas comprenden: cerveza malteada entera, cerveza elaborada bajo el “Reinheitsgebot”, ale, IPA, lager, amarga, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, cerveza cercana, cerveza ligera, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías, porter, cerveza bock, fuerte, licor de malta, cerveza no alcohólica, licor de malta no alcohólico y similares, pero también bebidas alternativas de cereal y malta tal como bebidas de malta con sabor a fruta, por ejemplo, bebidas de malta con sabor a cítrico, tal como limón, naranja, lima, o bayas, bebidas de malta con sabor a licor, por ejemplo, licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila, o bebidas de malta con sabor a café, tal como licor de malta con aroma de cafeína, y similares.
- Descomposición de materia basada en grano, por ejemplo, para producción de biocombustible
- 25 La enzima sintética (o la composición que comprende la enzima sintética) de la presente invención o tal como se describe en la presente invención puede usarse para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol durante el procesado de grano a partir de, por ejemplo, material basado en grano. El material basado en grano puede ser granos enteros (por ejemplo, trigo entero, cebada entera, centeno entero, triticale entero o granos de maíz o mezclas de los mismos) o porciones de los granos enteros, o mezclas de los mismos.
- 30 En una realización, la enzima sintética (o la composición que comprende la enzima sintética) de la presente invención o tal como se describe en la presente memoria puede usarse para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol en materiales basados en grano o granos enteros.
- Para evitar dudas, los granos enteros pueden ser machacados mecánicamente.
- 35 El material basado en grano puede ser descompuesto o degradado a glucosa. La glucosa puede usarse posteriormente como materia prima para un proceso de fermentación, por ejemplo, para la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) o la producción de bioproductos (por ejemplo, isopreno de base bio).
- El material basado en grano puede ser la materia prima de un proceso de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).
- 40 Hoy día, la mayor parte del etanol es producido a partir de grano de maíz, que es molido, tratado con enzimas amilasa para hidrolizar almidón a azúcares, se fermenta y se destila. Aunque se han realizado progresos sustanciales a la hora de reducir los costes de producción de etanol, sigue habiendo retos sustanciales. Todavía se necesitan mejores técnicas para reducir el coste de las materias primas de biocombustible para la producción de etanol. Por ejemplo, en la producción de etanol basada en grano, la degradación de arabinoxilanos puede aumentar la accesibilidad del almidón.
- 45 La presente invención proporciona una xilanasa sintética para uso en la descomposición de hemicelulosas, por ejemplo, arabinoxilano, particularmente AXinsol y AXsol.
- 50 Meramente a modo de ejemplo, en la industria de alcohol para combustible de Europa, los granos pequeños como trigo, cebada y centeno son materias primas habituales, en los EE.UU. se usa principalmente maíz. El trigo, la cebada y el centeno contienen, junto con el almidón, niveles elevados de polímeros polisacáridos no de almidón (NSP), como la celulosa, el beta-glucano y la hemicelulosa.
- La proporción en la que están presentes los diferentes NSPs difiere de una materia prima a otra. La siguiente tabla muestra las diferentes cantidades de NSPs en el trigo, la ceba y el centeno en comparación con otras materias primas.

Tabla 1. Polisacáridos no almidón (NSPs) 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 ¹ soluble y no soluble	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							

5 Los NSPs pueden generar una viscosidad elevada en las pulpas de grano. Una viscosidad elevada tiene un impacto negativo en la producción de etanol, ya que limita la concentración de sólidos que puede usarse durante la pulpación, y reduce la eficiencia energética del proceso. Adicionalmente, las hemicelulosas residuales presente a lo largo del proceso pueden contribuir a formación de depósitos en los intercambiadores de calor y el equipamiento de destilación. El mayor impacto de una viscosidad elevada se observa cuando una pulpa es enfriada hasta la temperatura de fermentación (32°C). Esto explica que la viscosidad necesite ser reducida en el proceso en un punto previo a la etapa de enfriamiento.

10 En una realización de la presente invención, el método para degradar material basado en grano comprende mezclar la xilanasa sintética descrita en la presente memoria tan pronto como sea posible en el proceso de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol), por ejemplo, preferiblemente durante la mezcla del material basado en grano al inicio del proceso. Una ventaja de añadir las xilanasas modificadas descritas en la presente memoria en una etapa inicial del proceso es que las enzimas descomponen la viscosidad inicial.

15 En una realización de la presente invención, el método para degradar material basado en grano comprende mezclar la xilanasa sintética descrita en la presente memoria antes o durante la licuefacción, sacarificación, fermentación, sacarificación y fermentación simultáneas, post-fermentación o una combinación de las mismas.

En una realización de la presente invención, el método para degradar material basado en grano comprende mezclar la xilanasa sintética descrita en la presente memoria durante la licuefacción (por ejemplo, una etapa de alta temperatura que sigue al mezclamiento).

20 Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere a reducir la viscosidad cuando se degradan materiales basados en grano, por ejemplo, en procesos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

Los beneficios de usar las xilanasas sintéticas incluidas en la presente memoria para reducir la viscosidad cuando se degradan materiales basados en grano, por ejemplo en procesos de producción de biocombustible (por ejemplo bioetanol) son múltiples:

- 25 • Se puede usar una pulpa de mayor sustancia seca en el proceso.
- Se pueden obtener mayores contenidos de sólido en el jarabe final.
- Mejor transferencia de calor, menor requerimiento energético.
- Ensuciamiento reducido del evaporador que conlleva menores costes de limpieza.
- Aumento de los rendimientos finales de etanol.
- 30 • Mejor calidad de DDGS (sub-producto)
- Mejor separación entre la parte sólida y la líquida durante la separación de posos (tras destilación). La menor viscosidad aumenta la eficiencia de separación.

35 Una ventaja significativa adicional de la presente invención es que el uso de la xilanasa sintética descrita en la presente memoria en la producción de biocombustible también puede dar como resultado unos (sub)productos mejorados del proceso, tal como torta húmeda, Granos Secos de Destilados (DDG) o Granos Secos de Destilados con Solubles (DDGS). Por lo tanto, una ventaja de la presente invención es, puesto que la torta húmeda, DDG y DDGS son (sub)productos de la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol), el uso de la presente invención puede dar como resultado una calidad mejorada de dichos (sub)productos. Por ejemplo, los arabinoxilanos de los (sub)productos pueden disolverse fácilmente durante el proceso de producción de biocombustible.

40 Separación de gluten de cereal (por ejemplo, trigo) – almidón

La xilanasa sintética (o la composición que comprende la xilanasa sintética) de la presente invención o tal como se describe en la presente memoria puede usarse para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol durante la separación de almidón de trigo y gluten.

5 Tras una separación inicial del salvado y el germen de trigo del endospermo, se aplica industrialmente un fraccionamiento de la harina de endospermo de trigo en fracciones de almidón y gluten a una escala grande para obtener almidón-A de alta calidad y los subproductos de almidón-B y gluten vital.

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

10 Adicionalmente, también se producen los subproductos de almidón-B y gluten vital. Cada producto individual es procesado adicionalmente para suplementar o modificar las características de producto alimentario en función de las necesidades del mercado.

15 Existen varios procesos de separación de trigo usados en la industria y descritos en bibliografía. Dichos procesos industriales difieren principalmente en las formas de las mezclas harina-agua presentadas al equipamiento de fraccionamiento (centrífuga, hidrociclón o criba) o en las condiciones de reacción iniciales como temperatura y aplicación de cizalla (Abdulahit Sayaslan, Lebensm.-Wiss. U.-Technol 37 (2004) 499-515, "Wetmilling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods").

20 En el método de separación de una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) en las fracciones de almidón y gluten, el método comprende mezclar una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo), agua y una xilanasa sintética. La harina de cereal, el agua y la xilanasa sintética pueden mezclarse simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) y el agua pueden mezclarse antes de mezclarse con la xilanasa sintética.

En general, la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) se mezcla formando una masa o mezcla, que varía entre 35 y 63% de sólidos secos, a temperaturas de ~20-45°C. A continuación, la mezcla es procesada adicionalmente:

25 1) se deja la mezcla reposar durante algún tiempo (-30 minutos) y se lava secuencialmente el almidón de la mezcla usando una criba, centrífuga o hidrociclón para separar la leche de almidón del gluten, o

2) se aplica cizalla a la mezcla, diluyendo opcionalmente la mezcla de forma adicional y separando después la harina de trigo mediante un hidrociclón, o un decantador centrífugo de 2 o 3 fases.

El término "sólidos secos" tal como se usa en la presente memoria significa los sólidos totales (disueltos o sin disolver) de una suspensión (en %) en base al peso seco.

30 En una realización de la presente invención, el método o uso reivindicado puede incluir las etapas de mezclar harina de trigo para formar una masa o mezcla de 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:

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

b) aplicar cizalla a la mezcla y diluir opcionalmente la mezcla de forma adicional, separando el almidón del gluten mediante un hidrociclón, o un decantador centrífugo de 2 o 3 fases.

40 La presente invención proporciona una mejora en la separación del almidón y el gluten a través de la adición de una xilanasa sintética como la incluida en la presente memoria de forma adecuada durante la etapa inicial de mezclado de harina y agua en los diversos procesos descritos anteriormente, usados para la separación de almidón de trigo. La separación se ve mejorada mediante la adición de una xilanasa sintética durante la etapa inicial de mezclado debido a la reducción de la viscosidad y a la hidrólisis de AXsol y/o AXinsol que interfieren con las partículas de gluten. Degradando dichos poli- y oligo-sacáridos, se potencia la aglomeración del gluten, mejorando el rendimiento de 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").

45 Una ventaja de la presente invención es que da como resultado mayores rendimientos de almidón-A y/o gluten de mejor calidad (por ejemplo, gluten vital de mejor calidad).

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

50 Una de las formas de evaluar la calidad del gluten es monitorizando la aglomeración del gluten. Cuando se aplica una determinada cantidad de fricción en el amasado de la masa o en el mezclado de la mezcla, las partículas de gluten tienden a aglomerarse en partículas más grandes que forman un entramado polimérico, denominado "gluten vital". El "gluten vital" puede añadirse a productos alimenticios para mejorar las propiedades de productos cocinados tal como

la resistencia de la masa, la caducidad y el volumen de pan (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey y C.W. Wrigley; "Wheat-gluten uses and industry needs"; Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 82-90).

5 En la industria panadera, la calidad y la cantidad de gluten en una harina de trigo se determina mediante un ensayo normalizado ICC n° 155 (AACC 38-12) usando un Glutomatic. En dicho dispositivo, se forma una masa a partir de harina de trigo (10,0 g) mezclada con una pequeña cantidad de disolución de NaCl al 2% (4,2 – 4,8 mL). Después de 20 segundos de etapa de mezclamiento, la masa es amasada continuamente a la vez que se lava durante 5 minutos con una disolución al 2% de NaCl a temperatura ambiente (~22°C) bombeada a través de la copa de mezcla con un caudal de ~70 mL/minuto. Durante esta etapa de lavado, el agua de lavado que contiene almidón es recogida y las partículas de gluten forman una bola de gluten en el soporte de tamiz de Glutomatic.

10 La calidad del gluten se mide evaluando la aglomeración de gluten. Esto se realiza centrifugando la bola de gluten en una centrífuga especial que contiene un tamiz pequeño. Las partículas de gluten que pasan a través del tamiz son pesadas (gluten pequeño) y se pesa la cantidad total de gluten. El índice de gluten se calcula como (gluten húmedo total – gluten húmedo pequeño) / gluten húmedo total. Cuanto más mejora la aglomeración de gluten, menor es la fracción de gluten pequeño y mayor será el valor de índice de gluten. Un índice de gluten alto, con un máximo teórico de 100%, indica una elevada calidad de la bola de gluten.

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 entre la cantidad total de harina seca usada en el experimento. Cuanto más gluten seco se recupera, mejor es la separación. El ensayo industrial está actualmente en adaptación para simular un proceso de separación de masa usado en la industria.

20 Dosificación

Preferiblemente, la xilanasa sintética está presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) en el rango de aproximadamente 500 XU/kg a aproximadamente 16000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), más preferiblemente de aproximadamente 750 XU/kg a aproximadamente 8000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), preferiblemente de aproximadamente 1500 XU/kg a aproximadamente 3000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), preferiblemente de aproximadamente 2000 XU/kg a aproximadamente 2500 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), e incluso más preferiblemente de aproximadamente 1000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) a aproximadamente 4000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

30 En una realización la xilanasa sintética está presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) en una dosis de más de aproximadamente 500 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada más de aproximadamente 600 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada más de aproximadamente 700 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada más de aproximadamente 800 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada más de aproximadamente 900 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada más de aproximadamente 1000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada más de aproximadamente 2000 XU/kg, de forma adecuada más de aproximadamente 2500 XU/kg, de forma adecuada más de aproximadamente 3000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

En una realización, la xilanasa sintética está presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) en una concentración de entre aproximadamente 2000 XU/kg y aproximadamente 2500 XU/kg.

40 En una realización, la xilanasa sintética está presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) a menos de aproximadamente 16000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada menos de aproximadamente 8000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada menos de aproximadamente 7000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada menos de aproximadamente 6000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada menos de aproximadamente 5000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), de forma adecuada menos de aproximadamente 4000 XU/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

50 Preferiblemente, la xilanasa sintética puede estar presente en una composición de aditivo de pienso en el rango de aproximadamente 100 XU/g a aproximadamente 320.000 XU/g de composición, más preferiblemente de aproximadamente 300 XU/g a aproximadamente 160.000 XU/g de composición, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 50.000 XU/g de composición, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 500 XU/g de composición a aproximadamente 40.000 XU/g de composición.

55 En una realización, la xilanasa sintética está presente en la composición de aditivo de pienso a una concentración de más de aproximadamente 100 XU/g de composición, de forma adecuada de más de aproximadamente 200 XU/g de composición, de forma adecuada de más de aproximadamente 300 XU/g de composición, de forma adecuada de más de aproximadamente 400 XU/g de composición, de forma adecuada de más de aproximadamente 500 XU/g de composición.

- 5 En una realización, la xilanasa sintética está presente en la composición de aditivo de pienso a una concentración de menos de aproximadamente 320.000 XU/g de composición, de forma adecuada menos de aproximadamente 160.000 XU/g de composición, de forma adecuada menos de aproximadamente 50.000 XU/g de composición, de forma adecuada menos de aproximadamente 40.000 XU/g de composición, de forma adecuada menos de aproximadamente 30.000 XU/g de composición.
- 10 La actividad de xilanasa puede expresarse en unidades de xilanasa (XU) medidas a pH 5,0 con AZCL-arabinoxilano (arabinoxilano de trigo reticulado con azurina, comprimidos Xylazyme, Megazyme) como sustrato. La hidrólisis con *endo*-(1-4)- β -D-xilanasa (xilanasa) produce fragmentos coloreados solubles en agua, y la velocidad de liberación de los mismos (aumento de la absorbancia a 590 nm) puede relacionarse directamente con la actividad enzimática. Las unidades de xilanasa (XU) se determinan relativamente respecto a un patrón de enzima (xilanasa Danisco, disponible en Danisco Animal Nutrition) en condiciones de reacción estándar, que son 40°C, 5 minutos de tiempo de reacción en tampón McIlvaine, pH 5,0.
- 15 La actividad de xilanasa de la enzima patrón se determina como la cantidad grupos terminales de azúcar reductores liberados desde un sustrato de avena-escanda-xilano por minuto a pH 5,3 y 50°C. Los grupos terminales de azúcar reductores reaccionan con ácido 3,5-dinitrosalicílico y se puede medir la formación del producto de reacción a través del aumento de la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica respecto a una curva de calibrado de xilosa (equivalentes de azúcar reductor). Una unidad de xilanasa (XU) es la cantidad de enzima patrón que libera 0,5 μ mol de equivalentes de azúcar reductor por minuto a pH 5,3 y 50°C.
- 20 En una realización, de forma adecuada la enzima se clasifica usando la clasificación E.C. mencionada anteriormente, y la clasificación E.C. designa una enzima que dicha actividad cuando se evalúa en el ensayo incluido en la presente memoria para determinar 1 XU.
- 25 Preferiblemente, la xilanasa enzimática está presente en la etapa de mezclado de un proceso de separación de almidón en la masa o mezcla en el rango de aproximadamente 0,01 kg/MT DS de masa o mezcla a aproximadamente 0,60 kg/MT DS, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 kg/MT DS a aproximadamente 0,45 kg/MT DS de masa o mezcla, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 0,10 kg/MT DS a aproximadamente 0,25 kg/MT DS de masa o mezcla.
- 30 En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación de almidón de trigo), la xilanasa sintética puede dosificarse en el rango 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 en sólidos secos y MT significa tonelada métrica.
- 35 En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación de almidón de trigo), la xilanasa sintética puede dosificarse en el rango de 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 en sólidos secos y MT significa tonelada métrica.
- 40 En algunas realizaciones (particularmente en la realización de separación de almidón de trigo) la xilanasa sintética puede dosificarse en el rango de aproximadamente 9 a aproximadamente 120000 unidades/kg de harina de trigo, de forma adecuada entre aproximadamente 500-2400 unidades/kg de harina de trigo, de forma adecuada 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 las condiciones del ensayo de madera de abedul mostradas a continuación:
- 45 Ensayo de madera de abedul
- La actividad de xilanasa de una enzima puede medirse usando madera de abedul con 1% de xilano (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1% procedente de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM) como sustratos. El ensayo se lleva a cabo en citrato sódico 50 mM, pH 5,3, tampón de Tween-80 al 0,005% a 50°C durante 10 minutos.
- 50 El azúcar reductor liberado se cuantifica mediante reacción con ácido 3,5-dinitrosalicílico y midiendo la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica respecto a una curva de calibrado de xilosa. En este ensayo, se define una unidad de xilanasa (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.
- 55 En algunas realizaciones (particularmente en la degradación de material basado en grano), la xilanasa sintética puede dosificarse en el rango 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 la degradación de material basado en grano) la xilanasa puede dosificarse a 2,9 g/proteína/MT DS de trigo (que es equivalente a 2,9 mg/kg DS).
- En algunas realizaciones (particularmente en la degradación de material basado en grano) la xilanasa puede dosificarse en el rango de aproximadamente 22 a aproximadamente 285000 unidades/kg, de forma adecuada de aproximadamente 1100 a aproximadamente 5700 unidades/kg, de forma adecuada de aproximadamente 2200 a

aproximadamente 2850 unidades/kg (en donde se define 1 unidad como la cantidad de enzima requerida para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo de madera de abedul descritas anteriormente).

5 La enzima sintética y/o la composición que comprende la enzima sintética según la presente invención puede diseñarse para una dosificación puntual o puede diseñarse para su uso (por ejemplo, alimentación) de forma diaria.

La cantidad óptima de la enzima sintética y/o de la composición que comprende la enzima sintética a usar en la presente invención dependerá del producto a tratar y/o del método de puesta en contacto del producto con la composición y/o del uso pretendido para la misma.

La cantidad de enzima sintética usada en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para ser efectiva.

10 La cantidad de enzima sintética usada en las composiciones debería ser una cantidad suficiente para ser efectiva y para permanecer suficientemente efectiva, por ejemplo, para mejorar las prestaciones de productos de piensos para animales que contienen dicha composición. Dicho periodo de eficacia debería extenderse al menos durante el tiempo de utilización del producto (por ejemplo, la composición de aditivo de pienso o el pienso que la contiene).

Formulación

15 En una realización, la enzima sintética puede formularse como un líquido, un polvo seco o un gránulo.

El polvo seco o los gránulos pueden prepararse utilizando medios conocidos por los especialistas en la técnica, tal como recubrimiento en lecho fluidizado de pulverización superior, en un pulverizador de fondo Wurster o mediante granulación en tambor (por ejemplo, granulación de alta cizalla), extrusión, recubrimiento en bandeja o en un mezclador de microingredientes.

20 Para algunas realizaciones, la enzima sintética puede recubrirse, por ejemplo, encapsularse.

En una realización, el recubrimiento protege la xilanas sintética del calor y puede considerarse un termoprotector.

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

25 En una realización, la composición de aditivo de pienso puede formularse en un gránulo para composiciones de pienso que comprenden: un núcleo; un agente activo; y al menos un recubrimiento, reteniendo el agente activo del gránulo al menos el 50% de la actividad, al menos el 60% de actividad, al menos el 70% de actividad, al menos el 80% de actividad tras las condiciones seleccionadas de uno o más de a) un proceso de peletización de pienso, b) un proceso de pretratamiento de pienso calentado con vapor, c) almacenamiento, d) almacenamiento como ingrediente en una mezcla no peletizada, y e) almacenamiento como ingrediente en una mezcla base de pienso o en una premezcla de pienso que comprende al menos un compuesto seleccionado de minerales traza, ácidos orgánicos, azúcares reductores, vitaminas, cloruro de colina y compuestos que dan como resultado una mezcla de base de pienso o una premezcla de pienso ácida o básica.

30 Con respecto al gránulo, al menos un recubrimiento puede comprender un material hidratante de humedad que constituye al menos el 55% p/p del gránulo; y/o al menos un recubrimiento puede comprender dos recubrimientos. Los dos recubrimientos pueden ser un recubrimiento hidratante de humedad y un recubrimiento de barrera de humedad. En algunas realizaciones, el recubrimiento hidratante de humedad puede suponer entre el 25% y el 60% p/p del gránulo y el recubrimiento de barrera de humedad puede constituir entre el 2% y el 15% p/p del gránulo. El recubrimiento hidratante de humedad puede seleccionarse entre sales inorgánicas, sacarosa, almidón y maltodextrina y el recubrimiento de barrera de humedad puede seleccionarse entre polímeros, gomas, suero y almidón.

40 El gránulo puede ser producido usando un proceso de peletizado de pienso y el proceso de pretratamiento de pienso puede llevarse a cabo entre 70°C y 95°C durante varios minutos, tal como entre 85°C y 95°C.

45 En una realización, la composición de aditivo de pienso puede formularse en un gránulo para pienso para animales que comprende: un núcleo; un agente activo, reteniendo el agente activo del gránulo al menos el 80% de la actividad tras almacenamiento y tras el proceso de peletización calentado con vapor donde el gránulo es un ingrediente; un recubrimiento de barrera de humedad; y un recubrimiento hidratante de humedad que supone al menos el 25% p/p del gránulo, presentando el gránulo una actividad de agua inferior a 0,5 antes del proceso de peletización calentado con vapor.

50 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 inorgánica. El recubrimiento hidratante de humedad puede suponer entre el 25% y el 45% p/p del gránulo y el recubrimiento de barrera de humedad puede suponer entre el 2% y el 10% p/p del gránulo.

El gránulo puede producirse usando un proceso de peletización calentado con vapor que puede llevarse a cabo entre 85°C y 95°C durante varios minutos.

En varias realizaciones, la enzima puede diluirse usando un diluyente, tal como polvo de almidón, caliza o similar.

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

- 5 En otra realización, la enzima sintética o la composición que comprende la enzima sintética puede formularse aplicando, por ejemplo, pulverizando, la(s) enzima(s) sobre un sustrato vehículo, tal como trigo molido, por ejemplo.

En una realización, la enzima sintética o la composición que comprende la enzima sintética según la presente invención puede formularse como una premezcla. A modo meramente de ejemplo, la premezcla puede comprender uno o más componentes de pienso, tal como uno o más minerales y/o una o más vitaminas.

- 10 En una realización, la enzima sintética para uso en la presente invención se formula con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado entre 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, propilen glicol, 1,3-propanodiol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.

- 15 Envasado

En una realización, se envasa la enzima sintética y/o la composición que la comprende (por ejemplo, composición de aditivo para pienso) y/o la premezcla y/o el pienso según la presente invención.

En una realización preferida, la composición de aditivo de pienso y/o la premezcla y/o el pienso se envasa en una bolsa, tal como una bolsa de papel.

- 20 En una realización alternativa, la composición de aditivo de pienso y/o la premezcla y/o el pienso puede sellarse en un recipiente. Se puede usar cualquier recipiente adecuado.

Formas

- 25 La enzima sintética o la composición que comprende la enzima sintética (por ejemplo, la composición de aditivo de pienso) de la presente invención y otros componentes y/o el pienso que los comprende pueden usarse en cualquier forma adecuada.

- 30 La enzima sintética o la composición que la comprende (por ejemplo, la composición de aditivo de pienso) de la presente invención puede usarse en la forma de preparaciones sólidas o líquidas, o alternativas de las mismas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos, cápsulas, pelets, comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, disoluciones o suspensiones, polvos, y gránulos que pueden ser humectables, secados por pulverización o secados por congelación. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, aunque sin limitación, disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas y acuo-orgánicas.

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

- 35 A modo de ejemplo, si la composición de la presente invención se usa en una forma sólida, por ejemplo peletizada, también puede contener uno o más de: excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato sódico, carbonato cálcico, fosfato cálcico dibásico y glicina; se pueden incluir desintegrantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón sódico, croscarmelosa sódica y determinados silicatos complejos; aglomerantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia; agentes lubricantes tales como estearato magnésico, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

- 40 Los ejemplos de vehículos nutricionalmente aceptables para uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, disoluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, vaselina, aceites vegetales, polietilen glicoles, propilen glicoles, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato magnésico, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite perfumado, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácido graso de petroetral, hidroximetil celulosa, polivinilpirrolidona, y similares.

- 45 Los excipientes preferidos para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilen glicoles de alto peso molecular.

- 50 Para las suspensiones acuosas y/o los elixires, la composición de la presente invención puede combinarse con diversos agentes edulcorantes y aromatizantes, materia colorante o colorantes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilen glicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Sujeto

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

- 5 El término “sujeto”, tal como se usa en la presente memoria, significa un animal.

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

En una realización, el “sujeto” es ganado.

- 10 El término “ganado”, tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier animal de granja. Preferiblemente, ganado es uno o más de rumiantes tal como bovinos (por ejemplo, vacas o toros (incluyendo terneros)), animales mono-gástricos tales como aves de corral (que incluyen pollos para carne, pollos y pavos), cerdos (incluyendo cochinitos), pájaros, animales acuáticos tal como peces, peces agástricos, peces gástricos, peces de agua dulce tal como salmón, bacalao, trucha y carpa, por ejemplo, carpa koi, peces marinos tales como lubina, y crustáceos tales como gambas, mejillones y vieiras), caballos (incluyendo caballos de carreras), ovejas (incluyendo corderos).

- 15 En otra realización, el “sujeto” es un animal doméstico o mascota o un animal mantenido en un entorno de zoológico.

La expresión “animal doméstico o mascota o animal mantenido en un entorno de zoológico” tal como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier animal relevante, incluyendo caninos (por ejemplo, perros), felinos (por ejemplo, gatos), roedores (por ejemplo, cobayas, ratas, ratones), pájaros, peces (incluyendo peces de agua dulce y peces marinos), y caballos.

- 20 Desempeño

Tal como se usa en la presente memoria, “el desempeño en el animal” se puede determinar a través de la eficiencia del pienso y/o la ganancia de peso del animal y/o de la ratio de conversión de pienso y/o por la digestibilidad de un nutriente de un pienso (por ejemplo, digestibilidad de aminoácido) y/o la energía digerible o la energía metabolizable en un pienso 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.

- 25 Preferiblemente, “el desempeño en el animal” se determina a través de la eficiencia del pienso y/o de la ganancia de peso del animal y/o por la ratio de conversión de pienso.

- 30 Con la expresión “desempeño mejorado en el animal” se pretende indicar que existe un aumento de la eficiencia del pienso, y/o un aumento de la ganancia de peso y/o una reducción de la ratio de conversión de pienso y/o una digestibilidad mejorada de nutrientes o energía en un pienso y/o un aumento de la retención de nitrógeno y/o un aumento de la respuesta inmune del sujeto como resultado del uso de la composición de aditivo de pienso de la presente invención en el pienso en comparación con el pienso que no comprende dicha composición de aditivo de pienso.

- 35 Preferiblemente, con “desempeño mejorado en el animal” se pretende indicar que existe un aumento de la eficiencia del pienso y/o un aumento de la ganancia de peso y/o una reducción de la ratio de conversión de pienso.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “eficiencia de pienso” se refiere a la cantidad de ganancia de peso por unidad de pienso cuando el animal es alimentado *ad-libitum*, o con una cantidad especificada de pienso durante un periodo de tiempo.

- 40 Con “aumento de la eficiencia de pienso” se pretende indicar que el uso de una composición de aditivo de pienso según la presente invención en un pienso da como resultado un aumento de la ganancia de peso por unidad de ingesta de pienso en comparación con un animal alimentado sin que esté presente dicha composición de aditivo de pienso.

Ratio de conversión de pienso (FCR)

Tal como se usa en la presente memoria, el término “ratio de conversión de pienso” se refiere a la cantidad de pienso proporcionado a un animal para aumentar el peso del animal en una cantidad especificada.

- 45 Una mejora de la conversión de pienso significa una menor ratio de conversión de pienso.

- 50 Con “una menor ratio de conversión de pienso” o “una mejora de la ratio de conversión de pienso” se pretende indicar que el uso de una composición de aditivo de pienso en un pienso da como resultado que se requiera una menor cantidad de pienso a proporcionar al animal para aumentar el peso del animal en una cantidad especificada en comparación con la cantidad de pienso requerida para aumentar el peso del animal en la misma cantidad cuando el pienso no comprende dicha composición de aditivo de pienso.

Digestibilidad de nutrientes

5 La digestibilidad de nutrientes tal como se usa en la presente memoria significa la fracción de un nutriente que desaparece del tracto gastrointestinal o de un segmento especificado del tracto gastrointestinal, por ejemplo, el intestino delgado. La digestibilidad de nutrientes se puede medir como la diferencia entre lo que se administra al sujeto y lo que sale con las heces del sujeto, o entre lo que se administra al sujeto y lo que permanece en lo digerido en un segmento especificado del tracto gastrointestinal, por ejemplo, el íleo.

10 La digestibilidad de nutrientes tal como se usa en la presente memoria se puede medir a través de la diferencia entre la captación de un nutriente y el nutriente excretado mediante la recolección total de lo excretado durante un periodo de tiempo; o mediante el uso de un marcador inerte que no es absorbido por el animal, y que permite al investigador calcular la cantidad de nutriente desaparecida en el tracto gastrointestinal completo, o en un segmento del tracto gastrointestinal. Dicho marcador inerte puede ser dióxido de titanio, óxido crómico o ceniza insoluble en ácido. La digestibilidad puede expresarse como un porcentaje del nutriente en el pienso, o como unidades másicas de nutriente digerible por unidad másica de nutriente en el pienso.

15 La digestibilidad de nutrientes tal como se usa en la presente memoria abarca la digestibilidad de almidón, la digestibilidad de grasa, la digestibilidad de proteína y la digestibilidad de aminoácidos.

20 La digestibilidad de energía tal como se usa en la presente memoria significa la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta de las heces o la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta de la digesta restante en un segmento especificado del tracto gastrointestinal del animal, por ejemplo el íleo. La energía metabolizable tal como se usa en la presente memoria se refiere a energía metabolizable aparente y significa la energía bruta del pienso consumida menos la energía bruta contenida en las heces, la orina, y los productos gaseosos de la digestión. La digestibilidad de energía y la energía metabolizable pueden medirse como la diferencia entre la ingesta de energía bruta y la energía bruta excretada con las heces o la digesta presente en un segmento especificado del tracto gastrointestinal usando los mismos métodos para medir la digestibilidad de los nutrientes, con correcciones apropiadas para la excreción de nitrógeno para calcular la energía metabolizable del pienso.

25 Combinación con otros componentes

La xilanasas sintética de la presente invención puede usarse en combinación con otros componentes.

En una realización, la xilanasas sintética de la presente invención puede usarse en combinación con un probiótico o un microbio alimentado directamente (DFM), por ejemplo, una bacteria alimentada directamente.

30 La combinación de la presente invención comprende la xilanasas sintética de la presente invención o una composición que comprende la xilanasas sintética, por ejemplo, una composición de aditivo de pienso, y otro componente que es adecuado para 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 (por ejemplo, enzimas de pienso adicionales o enzimas de malteado o elaboración de cerveza, o enzimas de procesamiento de grano o enzimas de separación de gluten de trigo-almidón).

35 Las enzimas adicionales adecuadas para uso en la presente invención pueden ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4); 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. 3.2.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), aciltransferasas de lípido (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 (por ejemplo 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), amilasas, alfa-amilasas (E.C. 3.2.1.1), otras xilanasas (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.2.1.72, E.C. 3.2.1.136), glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3), hemicelulasas, proteasas (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)), enzimas desramificantes, cutinasas, esterases y/o mannanasas (por ejemplo, una β -mannanasa (E.C. 3.2.1.78)).

45 En una realización (particularmente para aplicaciones de piensos) 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 (por ejemplo, subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una fitasa (por ejemplo, una 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8)).

50 En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una combinación de una amilasa (por ejemplo α -amilasas (E.C. 3.2.1.1)) y una proteasa (por ejemplo subtilisina (E.C. 3.4.21.62)).

En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una β -glucanasa, por ejemplo una endo-1,3(4)- β -glucanasa (E.C. 3.2.1.6).

En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una fitasa (por ejemplo una 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8)).

- En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una mannanasa (por ejemplo, una β -mannanasa (E.C. 3.2.1.78)).
- 5 En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una lipasa (E.C. 3.1.1.3), una aciltransferasa de lípido (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), de forma adecuada una lipasa (E.C. 3.1.1.3).
- En una realización (particularmente para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una proteasa (por ejemplo subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)).
- 10 En una realización el componente adicional puede ser un estabilizante o un emulsionante o un aglomerante o vehículo o un excipiente o un diluyente o un desintegrante.
- El término “estabilizante” tal como se usa aquí se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (por ejemplo, un producto de pienso) cambie con el tiempo.
- 15 El término “emulsionante” tal como se usa en la presente memoria se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de pienso) que evita la separación de emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gotitas, contenida una dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite-en-agua, donde la gotita o la fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua-en-aceite, donde el agua pasa a ser la fase dispersa y la fase continua es aceite. Mediante el uso de emulsionantes también se pueden estabilizar espumas, que son de tipo gas-en-líquido, y suspensiones, que son de tipo sólido-en-líquido.
- 20 Tal como se usa en la presente memoria el término “aglomerante” se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de pienso) que une el producto a través de una reacción física o química. Durante la “gelificación”, por ejemplo, se absorbe agua, proporcionando un efecto de aglomeración. Sin embargo, los aglomerantes pueden absorber otros líquidos, tal como aceites, que los mantienen dentro del producto. En el contexto de la presente invención, los aglomerantes típicamente se usarían en productos sólidos o de bajo contenido en humedad, por ejemplo, en productos de panadería: pastas, masas, pan y otros. Los ejemplos de aglomerantes de granulación incluyen uno o más de: polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.
- 25 Los “vehículos” son materiales adecuados para administración de la enzima e incluyen cualquier material conocido como tal en la técnica, tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante o similar, que no sea tóxico y que no interaccione con ningún componente de la composición de un modo negativo.
- 30 La presente invención proporciona un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición de aditivo de pienso) que comprende mezclar una enzima de la presente invención con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable seleccionado entre al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato cálcico), ciclodextrina, trigo o componente de trigo, sacarosa, almidón, Na_2SO_4 , talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbiato, glicerol, sacarosa, propilen glicol, 1,3-propano diol, glucosa, parabenos, cloruro sódico, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.
- 35 Los 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 leche y polietilen glicoles de alto peso molecular.
- Los ejemplos de “desintegrantes” incluyen uno o más de: almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica y determinados silicatos complejos.
- 40 Los ejemplos de “diluyentes” incluyen uno o más de: agua, etanol, propilen glicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- Los otros componentes pueden usarse simultáneamente (por ejemplo, cuando se encuentran mezclados juntos o incluso cuando se administran por diferentes rutas) o secuencialmente (por ejemplo, pueden administrarse por diferentes rutas) respecto a la xilanasas de la presente invención.
- 45 Preferiblemente, cuando la composición de aditivo de pienso de la presente invención se mezcla con otro(s) componente(s), DFM permanece viable.
- En una realización preferiblemente la composición de aditivo de pienso según la presente invención no comprende cromo o cromo orgánico.
- En una realización preferiblemente el aditivo de pienso según la presente invención no contiene glucanasa.
- 50 En una realización preferiblemente el aditivo de pienso según la presente invención no contiene ácido ascórbico.

Aislada

En un aspecto, preferiblemente la secuencia de aminoácidos, o el ácido nucleico, o la enzima según la presente invención se encuentra en forma aislada. El término "aislada" significa que la secuencia o la enzima o el ácido nucleico está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente diferente con el que la secuencia, enzima o ácido nucleico se asocia de forma natural, tal como se encuentra en la naturaleza. La secuencia, enzima o ácido nucleico de la presente invención puede proporcionarse en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los que la sustancia podría asociarse de otro modo. Por tanto, por ejemplo, puede estar sustancialmente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.

Purificada

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

Secuencia de nucleótidos

El alcance de la presente invención abarca secuencias de nucleótido que codifican proteínas que tienen las propiedades específicas tal como se definen en la presente memoria.

El término "secuencia de nucleótidos" tal como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de oligonucleótido o una secuencia de polinucleótido, y las variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tal como las porciones de las mismas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, si representa la cadena sentido o anti-sentido.

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

En una realización, el término "secuencia de nucleótidos" significa ADNc.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos cuando se refiere y cuando abarca el alcance *per se* de la presente invención, no incluye la secuencia de nucleótidos nativa según la presente invención cuando se encuentra en su entorno natural y cuando está unida a su(s) secuencia(s) asociada(s) de forma natural, que está(n) también en su entorno natural. Para facilitar la referencia, denominaremos a ésta la realización preferida de la "secuencia de nucleótidos no nativa". A este respecto, el término "secuencia de nucleótidos nativa" significa una secuencia de nucleótidos completa que está en su entorno nativo y cuando se encuentra ligada operativamente a un promotor completo con el cual se asocia de forma natural, promotor que también se encuentra en su entorno nativo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención puede ser aislada y/o purificada 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 puede expresarse mediante 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 se asocia de forma natural dentro de dicho organismo.

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

Preparación de la secuencia de nucleótidos

Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o una proteína que es adecuada para modificación, pueden identificarse y/o aislarse y/o purificarse a partir de cualquier célula u organismo que produzca dicha proteína. En la técnica se conocen bien diversos métodos para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias de nucleótidos. A modo de ejemplo, se pueden usar técnicas de amplificación de PCR para preparar más de una secuencia una vez que se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A modo de ejemplo adicional, se puede construir una biblioteca de ADN genómico y/o de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero procedente del organismo que produce la enzima. Si la secuencia de aminoácido de la enzima es conocida, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótido marcadas y usarse para identificar clones que codifican enzima procedentes de la biblioteca genómica preparada a partir del organismo. Alternativamente, se podría usar una sonda de oligonucleótido marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen enzimático conocido para

identificar clones que codifican enzima. En este último caso, se usan condiciones de hibridación y lavado de menor severidad.

5 Alternativamente, se podría identificar clones que codifican enzima insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas para enzima con la biblioteca de ADN genómico resultante, y a continuación llevando a placa las bacterias transformadas sobre placas de agar que contienen un sustrato de enzima (es decir, arabinosilano), permitiendo así la identificación de los clones que expresan la enzima.

10 En otra alternativa adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforoamidita descrito por Beucage S.L. et al., (1981) Tetrahedron Letters 22, pág. 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984) EMBO J. 3, pág. 801-805. El método de fosforoamidita se sintetizan los oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se maduran, se ligan y se clonan en los vectores apropiados.

15 La secuencia de nucleótidos puede tener un origen genómico mixto y origen sintético, un origen sintético mixto y de ADNc, o un origen genómico mixto y de ADNc, preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado) de acuerdo a técnicas estándar. Cada fragmento ligado se corresponde con diversas partes de la secuencia completa de nucleótidos. La secuencia de ADN también puede prepararse mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, tal como se describe en el documento US 4.683.202 o en Saiki R K et al., (Science (1988) 239, pág. 487-491).

Secuencias de aminoácido

20 El alcance de la presente invención también abarca secuencias de aminoácido de enzimas que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

Tal como se usa en la presente 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".

25 La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse desde una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos cuando se refiere o queda abarcada por se por el alcance de la presente invención no es una enzima nativa. A este respecto, el término "enzima nativa" significa una enzima completa que está en su entorno nativo y cuando ha sido expresada por su secuencia de nucleótidos nativa.

Identidad de secuencia u homología de secuencia

30 La presente invención también abarca el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia o de homología de secuencia con la(s) secuencia(s) de aminoácido de un polipéptido que tiene(n) las propiedades especificadas definidas en la presente memoria o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido (referida en la presente memoria como "secuencia(s) homóloga(s)"). Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una determinada homología con las secuencias de aminoácido objetivo y con las secuencias de nucleótidos objetivo. Aquí, el término "homología" puede considerarse igual a "identidad".

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

40 En el presente contexto, en algunas realizaciones se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que puede ser idéntica en al menos el 97,7%, preferiblemente idéntica en al menos el 98% o el 99% a la secuencia objetivo.

En algunas realizaciones, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que puede ser idéntica en al menos el 85%, preferiblemente idéntica en al menos el 90 o el 95% a la secuencia objetivo.

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

50 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, eliminaciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia objetivo.

En el presente contexto, la "secuencia objetivo" se refiere a la secuencia de nucleótidos o a la secuencia de polipéptido/aminoácidos según la invención.

Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de polipéptido se determina usando la SEQ ID No. 1 como secuencia objetivo en un alineamiento de secuencias. En una realización, la secuencia de polipéptido objetivo se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 11.

5 Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina usando la SEQ ID No. 2 como secuencia objetivo en el alineamiento de secuencias. En una realización, la secuencia objetivo para las secuencias de nucleótidos puede seleccionarse del grupo que consiste en SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 o SEQ ID No. 12.

10 Un “ácido nucleico original” o “aminoácido original” significa una secuencia de ácido nucleico o una secuencia de aminoácido, que codificada o que codifica para el polipéptido original, respectivamente.

En una realización, la presente invención se refiere a una proteína cuya secuencia de aminoácidos está representada en la presente memoria, o una proteína derivada de dicha proteína (original) por sustitución, eliminación o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína original y que tiene la actividad de la proteína original.

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

20 En una realización, la presente invención se refiere a una secuencia de ácido nucleico (o gen) que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos está representada en la presente memoria o que codifica una proteína derivada de su proteína (original) por sustitución, eliminación o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína original y que tiene la actividad de la proteína original.

25 En el presente contexto, en una realización se considera que una secuencia homóloga o una secuencia extraña incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser idéntica en al menos el 97,7%, preferiblemente idéntica en al menos el 98 o 99% respecto a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia objetivo).

30 En otra realización, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser idéntica en al menos el 85%, preferiblemente idéntica en al menos el 90 o el 95% a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención (la secuencia objetivo).

35 Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican para los sitios activos, etc., que la secuencia objetivo. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención es preferible expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden llevarse a cabo visualmente o, de forma más habitual, con la ayuda de programas de comparación de secuencia fácilmente disponibles. Dichos programas de ordenador disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología o el % de identidad entre dos o más secuencias.

40 El % de homología o el % de identidad pueden calcularse en secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con la otra secuencia y se comparan directamente todos los aminoácidos de una secuencia con los correspondientes aminoácidos de la otra secuencia, residuo a residuo. Esto se denomina alineamiento “sin huecos”. Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se llevan a cabo solo en un número relativamente corto de residuos.

45 Aunque éste es un método muy simple y consistente, falla al no tener en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o eliminación hará que los siguientes aminoácidos queden fuera del alineamiento, dando potencialmente como resultado por tanto una gran reducción del % de homología o del % de identidad cuando se lleva a cabo un alineamiento global.

50 Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación se diseñan para producir alineamientos óptimos que tengan en consideración las posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se logra insertando “huecos” en el alineamiento de secuencia para intentar maximizar la homología local.

55 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan “penalizaciones de hueco” a cada hueco que se produce en el alineamiento de tal modo que, para un mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con el menor número de huecos posible – que refleja una mayor coincidencia entre las dos secuencias comparadas – dará lugar a una mayor puntuación que uno con muchos huecos. Típicamente se usan “costes de afinado de hueco” para aplicar un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña por cada residuo

posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de hueco usado más habitualmente. Por supuesto, unas penalizaciones de hueco elevadas producen alineamientos optimizados con menor número de huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones de hueco. Sin embargo, es preferible usar los valores por defecto cuando se usan dichos softwares para comparaciones de secuencia.

5 El cálculo del % máximo de homología o del % máximo de identidad, por lo tanto, requiere en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, tomando en consideración las penalizaciones de hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de software que pueden llevar a cabo comparaciones de secuencia incluyen, aunque sin limitación, el paquete BLAST (ver Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed – Chapter 18), BLAST 2 (ver FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA se encuentran disponibles para búsquedas en línea y fuera de línea (ver Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60), tal como por ejemplo en la herramienta de búsqueda GenomeQuest (www.genomequest.com).

15 Aunque el % final de homología o el % final de identidad pueden medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento no se basa habitualmente en una comparación de pares todo-o-nada. En vez de eso, generalmente se usa una matriz de escala de puntuación de similitud que asigna puntuaciones a cada comparación por pares en base a la similitud química o la distancia evolucionaria. Un ejemplo de dicha matriz, usada habitualmente es la matriz BLOSUM62 – la matriz por defecto del grupo de programas BLAST. Los programas Vector NTI generalmente usan valores públicos por defecto o una tabla de comparación de símbolos específica, si se suministra (véase el manual de usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, es preferible usar los valores por defecto del paquete de Vector NTI.

Alternativamente, se pueden calcular los porcentajes de homología usando la característica de alineamiento múltiple en Vector NTI (Invitrogen Corp.), en base a un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

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

Si se emplean penalizaciones de hueco al determinar la identidad de secuencia, entonces se usan preferiblemente los siguientes parámetros para el alineamiento por pares:

PARA BLAST	
HUECOS ABIERTOS (GAP OPEN)	9
EXTENSIÓN DE HUECOS (GAP EXTENSION)	2

30

PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA
Matriz de peso	IUB	Gonnet 250
APERTURA DE HUECOS (GAP OPENING)	15	10
EXTENSIÓN DE HUECOS (GAP EXTEND)	6,66	0,1

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

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

40 De forma adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina en al menos 100 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 200 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 300 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 400 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 500 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 600 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 700 nucleótidos contiguos, preferiblemente en al menos 800 nucleótidos contiguos.

De forma adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos puede determinarse en toda la secuencia mostrada en la presente memoria.

5 De forma adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos puede determinarse en toda la secuencia mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 2 o SEQ ID No. 4 o SEQ ID No. 6 o SEQ ID No. 8 o SEQ ID No. 10 o SEQ ID No. 12. De forma adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos puede determinarse en la secuencia completa tal como se muestra en la presente memoria como SEQ ID No. 2.

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

10 De forma adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o de proteína puede determinarse en la secuencia completa mostrada en la presente memoria.

15 De forma adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o de proteína puede determinarse en toda la secuencia mostrada en la presente memoria como la secuencia madura, por ejemplo, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 11. De forma adecuada, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o de proteína puede determinarse en la secuencia completa mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 1.

En el presente contexto, el término "secuencia de consulta" significa una secuencia homóloga o una secuencia extraña, que se alinea con una secuencia objetivo a fin de ver si entra dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, dicha secuencia de consulta puede, por ejemplo, ser una secuencia de la técnica anterior o una secuencia de una tercera parte.

20 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 divididas por la longitud de la secuencia objetivo.

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

30 En una realización preferida adicionalmente, 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 objetivo.

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

40 Se pueden realizar sustituciones conservativas, por ejemplo según la Tabla incluida a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y preferiblemente en la misma línea de la tercera columna pueden sustituirse entre ellos:

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar – no cargado	C S T M
		N Q
	Polar – cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

45 La presente invención también abarca la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se usan ambos en la presente memoria para indicar el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que puede producirse, es decir sustitución similar-por-similar tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También puede producirse una sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuo por otra, o que

alternativamente implique la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (denominada en la presente memoria Z), ornitina de ácido diaminobutírico (denominada en la presente memoria B), norleucina ornitina (denominada en la presente memoria O), piriilalalina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

5 Los reemplazamientos también pueden realizarse con aminoácidos no naturales, que incluyen aminoácidos alfa* y alfa-disustituidos*, N-alquil aminoácidos*, ácido láctico*, derivados de haluro de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina*, ácido L-γ-amino butírico*, p-Br-fenilalalina*, p-I-fenilalanina*, L-alil-glicina*, β-alanina*, ácido L-α-amino butírico*, ácido L-γ-amino butírico*, ácido L-α-amino isobutírico*, ácido L-ε-amino caproico#, ácido 7-amino heptanoico*, L-metionina sulfona#, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*,
 10 derivados metílicos de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metil)*, L-Phe (4-isopropil)*, L-Tic (1,2,3,4-tetrahiroisoquinolina-3-ácido carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha utilizado para el propósito de la discusión anterior (relativa a la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrofóbica del derivado, mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrofílica del derivado, #* indica características anfipáticas.

15 Las secuencias de aminoácido variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualesquier dos residuos de aminoácido de la secuencia, incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de los espaciadores de aminoácido tales como residuos de glicina o β-alanina. Una forma adicional de variación implica la presencia de uno o más residuos de aminoácido en forma peptoide, y será bien entendida por los especialistas en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se usa para referirse a residuos de aminoácido
 20 variantes en los que el grupo sustituyente de carbono α está sobre el átomo de nitrógeno del residuo en lugar del carbono α. Los procesos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la técnica, 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 xilanasas para uso en la presente invención puede comprender una secuencia de polipéptido mostrada como SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7 o SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 11 con una sustitución conservativa de al menos uno de los aminoácidos.

25 De forma adecuada, puede haber al menos 2 sustituciones conservativas, tal como al menos 3 o al menos 4 o al menos 5.

De forma adecuada, puede haber menos de 15 sustituciones conservativas, tal como menos de 12, menos de 10 o menos de 8 o menos de 5.

30 Las secuencias de nucleótidos para uso en la presente invención pueden incluir en su interior nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conoce una serie de tipos diferentes de modificaciones de oligonucleótidos. Éstos incluyen metilfosfonato y cadenas principales de fosforotioato y/o la adición de acridina o cadenas de polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo para potenciar la actividad *in vivo* o la vida de las secuencias
 35 de nucleótido de la presente invención.

La presente invención también abarca el uso de secuencias de nucleótido que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado del mismo. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces dicha secuencia puede usarse como sonda para identificar secuencias codificadoras similares en otros organismos, etc.

40 Los polinucleótidos que no son 100% homólogos con respecto a las secuencias de la presente invención pero que entran dentro del alcance de la invención, pueden obtenerse de diferentes maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria pueden obtenerse, por ejemplo, sondeando bibliotecas de ADN preparadas a partir de un rango de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Adicionalmente, se pueden obtener otros homólogos, y dichos homólogos y los fragmentos de los mismos en general serán capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente memoria. Dichas secuencias
 45 pueden obtenerse sondeando bibliotecas de ADNc preparadas a partir de bibliotecas de ADN procedentes de otras especies animales, y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden la totalidad o parte de una cualquiera de las secuencias del listado de secuencias anexo en condiciones de severidad media a alta. Aplican consideraciones similares para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias de polipéptido o de nucleótidos de la invención.
 50

También se pueden obtener variantes y homólogos de cepas/especies usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para atacar secuencias dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácido de diferentes variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia
 55 pueden llevarse a cabo usando software de ordenador conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es ampliamente usado.

Los cebadores usados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de severidad menores a las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia individuales contra secuencias conocidas.

5 Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis sito-dirigida de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios de secuencia silenciosos para codón para optimizar las preferencias de codón para una célula hospedante particular en la que se están expresando las secuencias de polinucleótido. Otros cambios de secuencia pueden ser deseados a fin de introducir sitios de reconocimiento enzimático de restricción, o para alterar la propiedad o la función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

10 Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo, marcada con una marca reveladora por medios convencionales usando marcas radioactivas o no radioactivas, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán una longitud de al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos, y también quedan abarcados por el
15 término polinucleótidos de la invención, tal como se usa en la presente memoria.

Los polinucleótidos tales como polinucleótidos de ADN y las sondas según la invención pueden ser producidos recombinantemente, sintéticamente, o mediante cualquier medio disponible para los especialistas en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas estándar.

20 En general, los cebadores se producirán mediante medios sintéticos, que implican la fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, nucleótido a nucleótido. Las técnicas para hacer esto con medios automatizados están disponibles fácilmente en la técnica.

Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente usando medios recombinantes, por ejemplo mediante técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena de polimerasa). Los cebadores se pueden diseñar para contener sitios de reconocimiento de enzima de restricción adecuados, de tal modo que el ADN amplificado puede ser clonado
25 en un vector de clonación adecuado.

Numeración de aminoácidos

En la presente invención, se puede emplear una numeración específica de posiciones de residuo de aminoácido en las xilanasas usadas en la presente invención. Alineando la secuencia de aminoácidos de una muestra de xilanasas con la xilanasas de la presente invención (particularmente con la SEQ ID No. 1) es posible asignar un número a una
30 posición de residuo de aminoácido en dicha muestra de xilanasas que corresponde a la posición de residuo de aminoácido o a la numeración de la secuencia de aminoácido mostrada en la SEQ ID No. 1 de la presente invención.

Hibridación

35 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 hibridarse tanto con las secuencias de la presente invención como con secuencias que son complementarias a las mismas.

El término "hibridación" tal como se usa en la presente memoria incluirá "el proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria a través de emparejamiento de bases", así como el proceso de amplificación llevado a cabo en tecnologías de reacción en cadena de polimerasa (PCR).

40 La presente invención también abarca el uso de secuencias de nucleótido que son capaces de hibridarse con las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier fragmento o derivado de las mismas.

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

45 Preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones de severidad (por ejemplo, 50°C y 0,2xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, Na₃citrato 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Más preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones de alta severidad (por ejemplo, 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, Na₃citrato 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

50 La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótido que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (que incluyen secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

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

Preferiblemente, la hibridación se analiza en el total de las secuencias incluidas en la presente memoria.

5 Expresión de enzimas

La secuencia de nucleótidos para uso en la presente invención puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de proteína/enzima, en y/o a partir de una célula hospedante compatible.

La expresión se puede controlar usando secuencias de control, por ejemplo, secuencias reguladoras.

- 10 La proteína producida mediante una célula recombinante de hospedante por expresión de la secuencia de nucleótidos puede ser secretada o puede quedar contenida intracelularmente, dependiendo de la secuencia y/o del vector usado. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificadoras de la sustancia a través de una membrana de célula procariótica o eucariótica particular.

Vector de expresión

- 15 El término "vector de expresión" significa una construcción capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

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

- 20 La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede estar presente en un vector en el cual la secuencia de nucleótidos es ligada operativamente a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por parte de un organismo hospedante.

Los vectores para uso en la presente invención pueden ser transformados en una célula hospedante adecuada, tal como se describe a continuación, para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

La elección del vector, por ejemplo, un vector de plásmido, cósmido o fago, a menudo dependerá de la célula hospedante a la cual va a ser introducido.

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

- 30 Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o usarse para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedante.

De esta manera, en una realización adicional, la invención proporciona un método para preparar secuencias de nucleótido de la presente invención mediante la introducción de una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedante compatible, y creciendo la célula hospedante en condiciones en las que se producirá la replicación del vector.

- 35 El vector puede comprender además una secuencia de nucleótidos que permita que el vector se replique en la célula hospedante en cuestión. Los ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

Secuencias reguladoras

- 40 En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos para uso en la presente invención se liga operativamente a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por la célula hospedante elegida. A modo de ejemplo, la presente invención cubre un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención ligada operativamente a una secuencia reguladora, es decir el vector es un vector de expresión.

- 45 El término "ligado operativamente" se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos mantienen una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia reguladora "ligada operativamente" a una secuencia codificadora está ligada de un modo tal que se logra la expresión de la secuencia codificadora en una condición compatible con las secuencias de control.

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

El término "promotor" se usa en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de unión a polimerasa de ARN.

La expresión mejorada de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención también puede lograrse mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo regiones de promotor, líder de secreción y terminación.

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

Incluso se pueden usar otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido de la presente invención.

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en un hospedante bacteriano, fúngico o de levadura son bien conocidos en la técnica.

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

Construcciones

El término “construcción” – que es sinónimo de términos tales como “conjugado”, “casete” e “híbrido” – incluye una secuencia de nucleótidos para uso según 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 tal como una secuencia de intrón, tal como el Sh1-intrón o el ADH intrón, intermedia entre el promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo también es cierto para el término “fusionado” en relación a la presente invención, que incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no cubre la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína asociada ordinariamente con el promotor génico natural y cuando ambos se encuentran en su entorno natural.

20 La construcción incluso puede contener o expresar un marcador, lo que permite la selección de la construcción genética.

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

25 Células hospedantes

El término “célula hospedante” – en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprende la secuencia de nucleótidos o un vector de expresión como el descrito anteriormente, y que se usa en la producción recombinante de una proteína que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

En una realización el organismo es un hospedante de expresión.

30 Por tanto, una realización adicional de la presente invención proporciona células hospedantes transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos que expresa la proteína de la presente invención. Las células se elegirán para ser compatibles con dicho vector y por ejemplo pueden ser células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas o de levadura.

35 Los ejemplos de organismos hospedantes bacterianos adecuados son especies bacterianas gram positivas o gram negativas.

En una realización, las xilanasas incluidas en la presente memoria se expresan en el hospedante de expresión *Trichoderma reesei*.

40 En algunas realizaciones, el hospedante de expresión para las xilanasas incluidas en la presente memoria puede ser uno o más de los siguientes hospedantes de expresión fúngicos: *Fusarium* spp. (tal como *Fusarium oxysporum*); *Aspergillus* spp. (tal como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, o *A. awamori*) o *Trichoderma* spp. (tal como *T. reesei*).

En algunas realizaciones, el hospedante de expresión puede ser uno o más de los siguientes hospedantes de expresión bacterianos: *Streptomyces* spp. o *Bacillus* spp. (por ejemplo *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*).

45 El uso de células hospedantes adecuadas – tal como células hospedantes de levadura y fúngicas – puede proporcionar modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, miristoilación, glicosilación, truncado, lipidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) según sea necesario para conferir una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinantes de la presente invención.

Organismo

50 El término “organismo” en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido según la presente invención y/o los productos obtenidos a

partir de los mismos, y/o en donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos según la presente invención cuando está presente en el organismo.

En una realización, el organismo es un hospedante de expresión.

Los organismos adecuados pueden incluir un procarionte, un hongo, levadura o una planta.

5 El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido según la presente invención y/o los productos obtenidos a partir de la misma, y/o donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos según la presente invención dentro del organismo. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos se incorpora al genoma del organismo.

10 El término "organismo transgénico" no cubre secuencias codificadoras de nucleótidos nativos en su entorno natural cuando están bajo el control de su promotor nativo, que también se encuentra en su entorno natural.

Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende una cualquiera, o combinaciones, de las secuencias de nucleótido que codifican para el polipéptido según la presente invención, construcciones según la presente invención, vectores según la presente invención, plásmidos según la presente invención, células según la presente invención, tejidos según la presente invención, o productos de los mismos.

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

Transformación de células/organismo hospedantes

20 Como se ha indicado antes, el organismo hospedante puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Los ejemplos de hospedantes procarióticos incluyen *E. coli*, *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp., por ejemplo, *Bacillus subtilis*.

El conocimiento sobre la transformación de hospedantes procarióticos está bien documentado en la técnica, por ejemplo véase Sambrook *et al* ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd edition, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se usa un hospedante procariótico entonces puede ser necesario modificar de forma adecuada la secuencia de nucleótidos antes de la transformación – tal como mediante la eliminación de intrones.

25 Se pueden transformar células de hongo filamentoso usando diversos métodos conocidos en la técnica – tal como un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de un modo conocido. El uso de *Aspergillus* como microorganismo hospedante se describe en el documento EP 0 238 023.

La transformación de procariontes, hongos y levaduras generalmente es conocida por los especialistas en la técnica.

30 Un organismo hospedante puede ser un hongo – tal como un moho. Los ejemplos de hospedantes adecuados incluyen cualquier miembro que pertenezca a los géneros *Trichoderma* (por ejemplo *T. reesei*), *Thermomyces*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora* y similares.

En una realización, el organismo hospedante puede ser un hongo. En una realización preferida el organismo hospedante pertenece al género *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*).

35 Cultivo y producción

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

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

La proteína producida por una célula recombinante puede presentarse sobre la superficie de la célula.

La proteína puede secretarse desde las células hospedantes y puede recuperarse de forma conveniente del medio de cultivo usando procedimientos bien conocidos.

Secreción

45 A menudo, es deseable que la proteína sea secretada desde el hospedante de expresión al medio de cultivo, donde la proteína puede ser recuperada más fácilmente. Según la presente invención, la secuencia líder de secreción puede seleccionarse en base al hospedante de expresión deseado. También se pueden usar secuencias señal híbridas en el contexto de la presente invención.

Aplicación a gran escala

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

5 Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de entre 1g por litro y aproximadamente 100g por litro del volumen de cultivo celular total tras cultivar el organismo hospedante.

De forma adecuada la secuencia de aminoácidos puede ser producida en una cantidad de entre 30g por litro y aproximadamente 90g por litro de volumen de cultivo celular total tras cultivar el organismo hospedante.

Técnicas de metodología de ADN recombinante generales

10 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 especialista en la técnica. Dichas técnicas están explicadas en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Segunda edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; "Current Protocols in Molecular Biology", capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva 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". Cada uno de estos textos generales se incorpora a la presente memoria a modo de referencia.

Ensayos

20 Ensayo de actividad

Las xilanasas son evaluadas para determinar la actividad de xilanasas en WE-AX (arabinoxilano extraíble en agua) de trigo en presencia de albúmina de suero bovino (BSA). La cantidad de grupos terminales reductores aumenta cuando las xilanasas activas con arabinoxilano soluble hidrolizan enlaces β -1-4 en el sustrato. Con calor y condiciones alcalinas, los grupos terminales reductores reaccionan con el PAHBAH incoloro (hidrazida de ácido 4-para-hidroxibenzoico), con lo que el PAHBAH es oxidado y se mide la absorbancia a 410 nm (Lever, 1972. Analytical Biochemistry 47, 273-279).

Tampones y reactivos:

30 Acetato sódico 100 mM (NaAc), pH 5,0, BSA al 0,10%: se disuelven 9,6 g de trihidrato de acetato sódico en 800 mL de agua desionizada y se ajusta el pH a 5,0 con ácido acético concentrado. Posteriormente se añade agua desionizada a 1000 mL. Se disuelve 1,0 g de BSA (Sigma Aldrich, A7906) en 1000 mL de NaAc 100 mM, pH 5,0.

WE-AX, sustrato de arabinoxilano al 0,5%, pH 5,0: se humedecen 0,5 g de arabinoxilano de trigo soluble (Megazyme alta viscosidad, 43 cSt, P-WAXYH) con 5 mL de etanol al 96% y se añaden 95 mL de NaAc 100 mM, pH 5,0. La disolución se calienta a la vez que se agita hasta ebullición, y posteriormente se enfría con agitación hasta temperatura ambiente (RT).

35 Disolución de trabajo de PAHBAH: se preparan tres disoluciones: 1) hidróxido sódico 0,5 M (NaOH): 10,0 g de hidróxido sódico en 500 mL de agua desionizada; 2) HCl 0,5 M: 20,8 mL de HCl al 37% en 500 mL de agua desionizada; 3) disolución de reserva de PAHBAH al 5%: se disuelven 25,0 g de PAHBAH (4-hidroxibenzhidrazida, Sigma H9882) en 500 mL de HCl 0,5 M. La disolución se protege contra la luz y se almacena a 4°C. Justo antes de su uso, se preparó la disolución de trabajo de PAHBAH diluyendo la disolución de reserva de PAHBAH cinco veces con NaOH 0,5 M.

40 *Procedimiento:*

Todas las diluciones se prepararon con un robot dispensador Biomek (Beckman Coulter, EE.UU.) en MTPs (placa de reserva de ensayo y placa de ensayo: Microplaca de poliestireno Clear de 96 pocillos, Corning, Cat. no. 9017; Placa de PCR: VWR, Eu. Cat No. 211-0297; Placa de lectura: Kisker Biotech, Cat. No. G080-F)

45 1. Se diluyen 3 μ L de muestra de enzima (concentración en el rango de 40-65 μ g/mL) con 147 μ L de NaAc 100 mM, pH 5,0, tampón de BSA 0,1% en la placa de reserva de ensayo.

2. Se mezclan 25 μ L de muestra de la placa de reserva de ensayo con 150 μ L de sustrato WE-AX en la placa de ensayo.

3. La placa de ensayo se incuba a 30°C y con una agitación de 1150 rpm durante 15 minutos en un agitador iEMS (Thermo Scientific).

50 4. Tras finalizar la incubación, se mezclan 45,4 μ L de la mezcla de reacción procedente de la placa de ensayo con 135 μ L de disolución de trabajo de PAHBAH en una placa de PCR.

5. La placa de PCR se incuba en una máquina de PCR (Tetrad 2, peltier thermo cycler, Bio-Rad) a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se enfría a 20°C durante 10 segundos.

6. Se transfieren 100 µL de muestra a una placa de lectura y la placa se leyó a 410 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices).

5 Se calcula la actividad de todas las xilanasas sintéticas como la media de tres réplicas restando un blanco que comprende NaAc 100 mM, pH 5,0, tampón de BSA al 0,1% en lugar de enzima.

Ensayo de termoestabilidad

Tampones y reactivos:

10 Tween 80 al 1%: se disuelve 1 g de Tween 80 (Sigma P-8074) con 9 mL de tampón MES, pH 6,0, y a continuación se diluye adicionalmente 10 veces con tampón MES, pH 6.

Tampón MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 al 0,00125%: tampón MES 25 mM, pH 6,0: se disuelven 4,88 g de MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) en 800 mL de agua desionizada y se ajusta el pH a 6,0 con NaOH. Se añaden 1,25 mL de Tween 80 al 1% seguido de la adición de agua desionizada hasta 1000 mL.

Procedimiento:

15 La termoestabilidad de la xilanasas sintética se mide incubando las xilanasas sintéticas a una concentración de proteína de aproximadamente 1 µg/mL (rango: 0,8-1,3 µg/mL) en tampón MES 25 mM, Tween 80 al 0,00125%, pH 6,0 durante 10 minutos a temperatura elevada. Al final de la incubación, se mide la actividad residual correspondiente a las xilanasas sintéticas tratadas con calor como se describe en el Ensayo de Actividad (etapas 2-6).

20 La actividad residual de cada xilanasas sintética se calcula como la media de tres réplicas restando un blanco que incluye tampón MES 25 mM, Tween 80 al 0,00125%, pH 6,0, en lugar de enzima. La actividad residual se calcula como la ratio entre la actividad mediada para la muestra tratada con calor y la actividad medida para una muestra idéntica, que no ha sido incubada a temperatura elevada.

Ensayo de resistencia a pepsina

25 La capacidad de las xilanasas sintéticas para resistir la degradación con pepsina se evalúa a 40°C en una disolución tamponada a pH 3,5.

La capacidad de las xilanasas sintéticas para resistir la degradación con pepsina se mide incubando las xilanasas sintéticas en tampón de glicina 100 mM, pH 3,5, que contiene 0,2 g/L de pepsina durante 2 horas a 40°C y 1150 rpm en un agitador iEMS (Thermo Scientific). Al final de la incubación, la actividad residual correspondiente a las xilanasas sintéticas se mide como se describe en el Ensayo de Actividad (etapas 2-6).

30 *Tampones y reactivos:*

Tampón de glicina 100 mM, pH 3,5: se disuelven 7,52 g de glicina en 800 mL de agua desionizada y se ajusta el pH a pH 3,5 con HCl. Posteriormente se añade agua desionizada hasta 1000 mL. Disolución de pepsina 0,2 mg/mL: se disuelven 0,2 g de pepsina (Sigma, P-7000) en 1000 mL de tampón de glicina 100 mM, pH 3,5.

35 Se calcula la actividad residual de cada xilanasas sintética como la media de tres réplicas restando un blanco que incluye disolución de pepsina 0,2 mg/mL en lugar de enzima. La actividad residual de cada xilanasas sintética se calcula como la ratio entre la actividad medida para las muestras tratadas con pepsina y la actividad mediada para el ensayo de actividad con muestras no tratadas.

Ensayo de solubilización

Tampones y reactivos:

40 Tampón MES 100 mM, pH 6,0: se disuelven 19,52 g de MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) en 800 mL de agua desionizada y se ajusta el pH a 6,0 con NaOH. A continuación se añade agua desionizada hasta 1000 mL.

45 Disolución de sustrato de DDGS de maíz, al 10%: se hidrata cDDGS con tamaño de partícula <212 µm en tampón MES 100 mM, pH 6,0, mediante agitación 15 minutos a 600 rpm. Inmediatamente después de terminar la agitación, se ajusta el pH si se produce una caída del pH producida por residuos ácidos en el cDDGS. Se transfieren 190 µL/pocillo de sustrato cDDGS a las placas de sustrato, que se almacenan a -20°C hasta su uso.

Procedimiento:

Todas las diluciones se preparan con un robot dispensador Biomek (Beckman Coulter, EE.UU.) en MTPs (placa de sustrato y placa de recolección: microplacas de poliestireno de 96 pocillos Clear, Corning, Cat. no. 9017; placa de

filtro: membrana de PVDF de 0,2 µm, Corning, Cat. no. 3504; placa de pocillo de media profundidad: placa de almacenamiento cuadrada de 1,2 mL de perfil bajo, Cat. No. AB-1127, Thermo Scientific.

1. Se añaden 10 µL de muestra de enzima (concentración aparente de 150 µg/mL) a las placas de sustrato prefabricadas.
- 5 2. Incubación en iEMS a 40°C durante 240 minutos.
3. Se transfieren 170 µL de muestra procedentes de la placa de sustrato incubado a la placa de filtración.
4. Las placas de filtración se colocan en la parte superior de una placa de recolección y se centrifugan durante 10 minutos a 1666xg.
5. Las placas de recolección se almacenan a -20°C antes de continuar con el análisis.
- 10 6. Se diluyen 100 µL de la placa de recolección con 900 µL de agua Milli Q en una placa de pocillo de profundidad media y se mezcla durante 2 minutos en una mesa de agitación antes de transferir al aparato Skalar.

Cuantificación de pentosanos

La cantidad total de azúcares C5 (pentosanos) puesta en disolución se mide usando un aparato de inyección de flujo continuo (sistema SKALAR) según el método descrito por Rouau & Surget (1994, Carbohydrate Polymers, 24, 123-132). Los sobrenadantes se tratan con una mezcla de CH₃COOH y HCl para hidrolizar polisacáridos a monoazúcares. Se añade floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) para reaccionar con las monopentosas y las monohexosas para formar un complejo coloreado. Midiendo la absorbancia a 550 nm con 510 nm como longitud de onda de referencia, se calcula la concentración de pentosa en disolución usando una curva de calibrado de xilosa (50-400 µg de xilosa/mL). Al contrario que el complejo pentosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo hexosa-floroglucinol es constante en dichas longitudes de onda. Se añade glucosa (0,3%) a la disolución de floroglucinol para crear una señal constante de glucosa y asegurar adicionalmente que no hay interferencias de los azúcares de hexosa.

Los resultados se pueden presentar como índice de desempeño (PI), que se calcula como la ratio entre los valores después de incubación de cDDGS respectivamente con y sin adición de la xilanasa sintética: (cantidad total de azúcares C5 en disolución tras incubación con xilanasa sintética) / (cantidad total de azúcares C5 en disolución tras incubación sin enzima presente).

Proceso de peletización y determinación de actividad residual de xilanasa después de que un pienso que comprende el polipéptido ha sido acondicionado durante 30 segundos a 90°C, por ejemplo, como parte de un proceso de peletización.

Durante el proceso de peletizado se puede formular una enzima en un sustrato, por ejemplo, trigo, y puede formularse en una premezcla, por ejemplo, una mezcla de pienso de maíz/soja (tal como 61,1% de maíz, 31,52% de soja Hipro 48, 4,00% de aceite de soja, 0,40% de bicarbonato sódico, 0,25% de vitaminas/minerales Leghennen, 0,20% de DL-metionina, 1,46% de fosfato dicálcico, 1,16% de caliza).

La xilanasa puede incluirse a un nivel que asegure que se alcanza una dosis objetivo final, por ejemplo, 20 000 XU/kg de pienso. La premezcla se puede preparar mezclando la(s) enzima(s) formulada(s) en el sustrato, por ejemplo trigo, en una mezcla de pienso (harina), por ejemplo, 10 kg de mezcla de pienso de maíz/soja, y mezclarse durante un tiempo especificado, por ejemplo 10 minutos.

La premezcla puede añadirse al pienso, por ejemplo 110 kg de pienso, y mezclarse durante un tiempo especificado, por ejemplo 10 minutos, antes de acondicionar. El pienso que comprende la enzima se acondiciona típicamente durante 30 segundos a 90°C antes del peletizado.

El término “se acondiciona” o “acondicionar” tal como se usa en la presente memoria significa mezclar la mezcla pienso/enzima y tratarla con vapor seco para alcanzar una temperatura objetivo de 90°C tras 30 segundos.

El acondicionamiento se puede llevar acabo colocando la mezcla pienso/enzima en un mezclador, por ejemplo un mezclador en cascada (tal como un mezclador KAHL, longitud 130 cm, diámetro 30 cm, velocidad 155 rpm). El tiempo de residencia para 300 kg/h es de aproximadamente 30 segundos, calculado como se indica a continuación:

45 Capacidad: 300 kg/h – 83,3 g/s

Llenado medido en el mezclador en cascada: 2500 g

Tiempo de residencia en el mezclador en cascada: 2500 g / 83,3 g/s = 30 s

En un lateral de mezclado en cascada se puede montar un colector con un descargador de agua y 3 válvulas de vapor, desde las cuales el vapor puede ser dirigido a la harina (por ejemplo, mezcla de pienso) o a la mezcla de pienso/enzima.

El vapor en este sistema puede venir proporcionado por una caldera de alta presión, por ejemplo una caldera Dan Stoker, capacidad máxima 400 kg de vapor/h. Se pueden realizar pruebas con una sobrepresión de 2 atm y el vapor puede ser dirigido a una válvula de reducción, que controla la adición de vapor al mezclador en cascada. Las tres válvulas del colector pueden usarse para un ajuste fino de la temperatura deseada para la harina (por ejemplo mezcla de pienso) o la mezcla de pienso/enzima. Añadiendo 1% de vapor a la harina (por ejemplo mezcla de pienso) o a la mezcla de pienso/enzima la temperatura aumenta en 14°C.

Tras el acondicionamiento, la mezcla pienso/enzima puede conformarse en pelets. Los pelets pueden conformarse en una prensa de pelets Simon Heesen con un troquel de Ø 3 mm * 35 mm. La capacidad se fija en 300 kg/h y se ajusta al tornillo de dosificación. La harina/premezcla se calienta hasta la temperatura objetivo entre 65 y 95°C con vapor en el mezclador en cascada. La cantidad de vapor puede regularse mediante una válvula de reducción de la presión y un colector. Para cada nivel de temperatura, la primera toma de muestra se realiza cuando la operación se ha establecido después de 8-10 minutos del peletizado.

La prensa de pelets puede ser una Simon Heesen, tipo trabajo (monorrodillo) con un motor de 7,5 kW. Diámetro interno del troquel: 173 mm, altura del rodillo de prensa: 50 mm, diámetro del rodillo de prensa: 140 mm. Prensa de peletizado: 500 rpm y capacidad nominal: 300 kg/h.

Se pueden tomar muestras después de la prensa de peletizado. Son enfriadas, por ejemplo en una caja de enfriamiento particionada con fondo perforado, ventilador: 1500 m³ de aire/h.

La mezcla de pienso que contiene xilanasa (harina) y los pelets de pienso resultantes son molidos usando un molino de laboratorio Perten, antes de analizar la actividad de xilanasa de las muestras usando arabinoxilano reticulado con azurina procedente de trigo como sustrato. Se mezclan 5,0 g de muestra molida con 50 mL de tampón McIlvaine, pH 5,0 y se agita en un agitador magnético durante 10 minutos. El extracto se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio. Se mezclan 100 µL de extracto con 400 µL de tampón McIlvaine, pH 5,0 y se equilibra a 50°C durante 2 minutos. Se añade un comprimido de 60 mg de Xylazyme (Megazyme, Irlanda) para iniciar la reacción y las muestras se incuban a 50°C durante 60 minutos antes de parar la reacción añadiendo 5 mL de tris(hidroximetil)aminometano al 2% (Sigma, T-1503). La disolución se mezcla usando un vortex, se deja reposar durante 5 minutos y se mezcla de nuevo antes de centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Se mide la absorbancia del sobrenadante a 590 nm. Todas las muestras se miden por duplicado.

Se cuantifica la actividad de xilanasa usando una curva de calibrado de xilanasa preparada en harina de blanco (sin enzima) y pienso de 90°C. La actividad para la muestra de harina que comprende la xilanasa se fija en 100% y se calcula la actividad residual de la xilanasa sintética en el pelet de pienso acondicionado a 90°C referida a ella.

A continuación se describirá la invención, meramente a modo de ejemplo, en referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Generación de xilanasas sintéticas

Construcción de plásmido

Los genes que codifican las xilanasas sintéticas mostradas como SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 y 12 fueron generados mediante una síntesis génica *de novo* (GeneArt GmbH, Alemania). A continuación, las xilanasas sintéticas fueron clonadas por el vendedor en el vector de destino pTTT-pyr2 mediante una técnica de recombinación Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los plásmidos de expresión resultantes pTTTpyr2-synXyn_VAR (Figura 13) que expresan las xilanasas sintética fueron amplificados en la cepa DH5a de *Escherichia coli*, se purificaron, se secuenciaron y se dispusieron individualmente en 96 MTPs y se usaron para transformación fúngica como se describe en más detalle. El vector de expresión contiene el promotor *cbh1* de *T. reesei* y las regiones terminadoras que permiten una expresión inducible fuerte de un gen de interés, los marcadores selectivos *amdS* de *Aspergillus nidulans* y *pyr2* de *T. reesei* que confieren crecimiento de transformantes en medio mínimo con acetamida en ausencia de uridina. Los plásmidos se mantienen autónomamente en la célula fúngica debido a regiones de telómeros derivadas de *T. reesei*. El uso de plásmidos replicativos da como resultado frecuencias incrementadas de transformación y solventa los problemas de expresión dependiente de localización observados con la transformación fúngica integrativa.

Cepas fúngicas, medios de crecimiento y transformación

Se transformaron plásmidos de expresión (5-10 µL) usando un método de PEG-protoplasto en una cepa de *T. reesei* con eliminaciones de las principales celulasas y xilanasa 2 ($\Delta cbh1 \Delta cbh2 \Delta egl1 \Delta egl2 \Delta egl3 \Delta egl4 \Delta egl5 \Delta egl6 \Delta bg11 \Delta man1 \Delta xyn2 \text{ Prdiv: } iRNA_{xyn1} \text{ } xyn3: amdS \text{ } pyr2$ -). Se logró una regulación a la baja adicional de la xilanasa endógena 1 y 3 de fondo introduciendo en el genoma de la cepa hospedante una casete de interferencia de ARNi dirigida a anular la expresión de *xyn1* y *xyn3* simultáneamente. Todas las transformaciones de alta capacidad fueron llevadas a cabo robóticamente en un formato de MTP de 24 pocillos usando robots Biomek (Beckman Coulter, EE.UU.). Los plásmidos con xilanasas sintéticas fueron recibidos de los vendedores en MTPs de 96 pocillos organizados según una estructura predeterminada. Las mezclas de transformación que contenían aproximadamente 1 µg de ADN y 5 x 10⁶

protoplastos en un volumen total de 50 μL fueron tratados con 200 μL de disolución PEG al 25%, diluidos con 1 volumen de sorbitol 1,2M/Tris 10 mM, pH 7,5 /disolución de CaCl_2 10 mM, reorganizados robóticamente en MTPs de 24 pocillos y mezclados con 1 mL de medio mínimo de agarosa al 3% que contiene sorbitol 1M y NH_4Cl 10 mM. Tras el crecimiento de los transformantes, se agruparon esporas de cada pocillo y se reparchearon en MTPs de 24 pocillos frescos con MM que contenía acetamida para una presión selectiva adicional. Una vez esporuladas, las esporas fueron recolectadas y usadas para inoculación de cultivos líquidos en un formato de MTP de 24 pocillos o en matraces de agitación en el siguiente medio de producción: 37 g/L de glucosa, 1 g/L de soforosa, 9 g/L de aminoácidos, 10 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 33 g/L de 1,4-piperazinebis(ácido propanosulfónico), pH 5,5, 2,5 mL/L de 400X elementos traza de *T. reesei* (175 g/L de ácido cítrico, 200 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/L de ácido bórico). Se añadió 1 mL de medio de producción para producir xilanasas sintéticas en MTPs de 24 pocillos. Para los matraces de agitación, los volúmenes fueron escalados.

Las placas fueron cultivadas durante 6 días a 28°C y con un 80% de humedad con agitación a 200 rpm. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y se filtraron a través de una placa de filtración Millipore Multiscreen usando un sistema de vacío de Millipore. Los sobrenadantes del cultivo fueron recolectados mediante filtración a vacío y se usaron para evaluar su desempeño, así como su nivel de expresión.

El perfil de proteínas de las muestras de caldo de cultivo completo fue determinado mediante electroforesis PAGE en NuPAGE® Novex 10% Bis-Tris Gel con tampón de elución MES SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Las bandas de polipéptido se visualizaron con SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

Para producción a mayor escala, se llevó a cabo una fermentación en un reactor agitado autoclavable de 6 litros de Continuers. Los matraces de agitación fueron inoculados con esporas e incubados con agitación durante 3 días a 28°C en el siguiente medio de matraz de agitación: 5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,5 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 14,4 g/L de ácido cítrico $\times 1\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 27,5 g/L de glucosa, 1 gota de agente antiespumante (EROL DF 6000K). El pH se ajustó con NaOH (2M) hasta 5,5 y el medio se autoclavó 20 minutos a 122°C. Tras enfriar, se añadieron 2,5 mL/L de elementos traza de *T. reesei* 400X (175 g/L de ácido cítrico, 200 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/L de ácido bórico). Las células del matraz de agitación se usaron para inocular el biorreactor que contenía el siguiente medio de Biorreactor: 4,7 g/L de KH_2PO_4 , 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 45 g/L de glucosa, 0,7 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g/L de agente antiespumante (EROL DF 6000K), 2,5 mL/L de elementos traza de *T. reesei* 400X (175 g/L de ácido cítrico, 200 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 16 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,2 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,4 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,8 g/L de ácido bórico). La temperatura se controló a 34°C; el pH se controló de forma continua añadiendo hidróxido amónico al 20%. El oxígeno disuelto se controló hasta un mínimo de 40% de saturación variando la velocidad de agitación. Se midió el contenido de dióxido de carbono y oxígeno del gas producido. Cuando la glucosa inicial se había agotado se inició una alimentación continua de glucosa/soforosa. Al mismo tiempo se redujo la temperatura y se controló en 28°C, el pH se aumentó y se controló en 4,5. La fermentación finalizó después de 140 horas. Se retiró el caldo del tanque, y las células fueron separadas por filtración. Tras la separación celular, el filtrado se concentró mediante ultrafiltración. Finalmente, el concentrado se esterilizó por filtración y se usó para los estudios de estabilidad en el peletizado.

Ejemplo 2 – Desempeño de la xilanasas sintética

Además de ser buenos en términos de bio-eficacia (por ejemplo, presentan un efecto positivo sobre el desempeño en el animal) los nuevos productos de xilanasas para uso comercial, por ejemplo para aplicación en piensos, también deben presentar buenas características de producto, que incluyen estabilidad durante el procesado.

Se han identificado polipéptidos sintéticos que presentan actividad de xilanasas. Se observó que los polipéptidos sintéticos son termoestables. Se observó que las xilanasas sintéticas presentan una alta recuperación (actividad residual) tras someterse al proceso de peletizado. Las xilanasas sintéticas fueron capaces de degradar WU-AX (arabinoxilano extraíble en agua) de DDGS (por ejemplo DDGS de maíz – y por tanto maíz solubilizable). Además, se observó que los polipéptidos sintéticos eran resistentes frente a la degradación por pepsina.

El propósito de las xilanasas sintéticas en el pienso es maximizar la utilización de energía de un pienso haciendo que más fibras insolubles sean digeridas y llevadas a disolución, haciendo que más nutrientes estén disponibles y por tanto produciendo más polisacáridos no almidón (NSP) fermentables.

Además de la elevada bio-eficacia (por ejemplo presentan un efecto positivo sobre el desempeño en el animal) las nuevas xilanasas sintéticas incluidas en la presente memoria presentan buenas características de producto, que incluyen termoestabilidad, estabilidad frente al procesado en caliente (por ejemplo peletización) y/o resistencia a pepsina.

Las xilanasas sintéticas fueron evaluadas en una serie de ensayos detallados a continuación en la sección de materiales y métodos.

Materiales y métodos

Normalización

5 Las xilanasas sintéticas se normalizaron en base a la actividad. Las muestras sin purificar fueron diluidas 20 y 130 veces, respectivamente, y se midió la actividad usando el ensayo de actividad junto con una curva de calibrado de xilanasas comerciales con las siguientes concentraciones: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 70 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras fueron diluidas en NaAcetato 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0. Las muestras con una concentración aparente inferior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ fueron cuantificadas usando la dilución de 20 veces, mientras que el resto de las muestras fueron cuantificadas usando la dilución de 130 veces. Las muestras sin purificar de xilanasas sintéticas fueron diluidas posteriormente hasta una concentración aparente de 150 $\mu\text{g/mL}$ con NaAcetato 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0 en una placa de microtitulación (MTP) (la placa normalizada) con un volumen de pocillo a 210 μL . Se diluyeron 53 μL de la muestra normalizada hasta una concentración aparente de 50 $\mu\text{g/mL}$ con 107 μL de NaAcetato 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0.

Cuantificación

15 Las muestras de la placa normalizada fueron cuantificadas usando el sistema de Criterion Gel. Se mezcló tampón de muestra Laemmli (Bio-rad nº161-0737) con ditioneitol (DTT) (Bio-rad nº161-0611) y agua MilliQ hasta una concentración final tras adición de la enzima al 50% de tampón de muestra Laemmli con DTT 50 mM. Se mezcló intensamente 70 μL de mezcla de tampón de muestra Laemmli con 10 μL de muestra procedentes de la placa normalizada en paralelo a curva de calibrado preparada con xilanasas comerciales purificadas diluidas en NaAcetato 25 mM, NaCl 250 mM, pH 4,0, hasta las siguientes concentraciones: 120, 160, 200, 240, 280 y 320 $\mu\text{g/mL}$.

20 El peso molecular (Mw), el número de triptófano además de la ratio de número de triptófano a Mw de cada una de las xilanasas sintéticas se muestra en la Tabla 1. La concentración de cada xilanasas se calculó corrigiendo la concentración de xilanasas comerciales aparente, lo cual se realizó multiplicando la ratio de número de triptófano a Mw correspondiente a la xilanasas comerciales por la ratio de número de triptófano a Mw correspondiente a la xilanasas sintéticas. Se determinó que la concentración de todas las muestras de xilanasas sintéticas de la placa normalizada estaba en el rango de 120-200 $\mu\text{g/mL}$.

25 Tabla 1. Mw y ratios de número de triptófano a Mw correspondientes a todas las xilanasas sintéticas.

	MW	#W	#W/MW
SynXyn72	32593	7	0,02147
SynXyn80	33103	7	0,02114
SynXyn85	32929	7	0,02125
SynXyn89	32854	7	0,02130
SynXyn92	32894	7	0,02128
SynXyn93	32894	7	0,02128
Xilanasas comerciales	33254	8	0,02406

Ensayo de actividad

30 Las xilanasas sintéticas fueron evaluadas en términos de actividad de xilanasas con WE-AX de trigo (arabinosilano extraíble en agua) en presencia de albúmina de suero bovino (BSA). La cantidad de grupos terminales reductores aumentó cuando las xilanasas activas en el arabinosilano soluble hidrolizaron los enlaces β 1-4 del sustrato. Aplicando calor y condiciones alcalinas, los grupos terminales reductores reaccionaron con el PAHBAH incoloro (hidrazida de ácido 4-para-hidroxibenzoico), con lo que el PAHBAH fue oxidado y se midió la absorbancia a 410 nm (Lever, 1972, Analytical Biochemistry, 47, 273-279).

Tampones y reactivos:

35 Acetato sódico 100 mM (NaAc), pH 5,0, BSA al 0,10%: se disolvieron 9,6 g de trihidrato de acetato sódico en 800 mL de agua desionizada y el pH se ajustó a 5,0 con ácido acético concentrado. Posteriormente se añadió agua desionizada hasta 1000 mL. Se disolvió 1,0 g de BSA (Sigma Aldrich, A7906) en 1000 mL de NaAc 100 mM, pH 5,0.

40 WE-AX, sustrato de arabinosilano al 0,5%, pH 5,0: se humedecieron 0,5 g de arabinosilano de trigo soluble (Megazyme alta viscosidad 43 cSt, P-WAXYH) con 5 mL de etanol al 96% y se añadieron 100 mL de NaAc 100 mM, pH 5,0. La disolución se calentó con agitación hasta ebullición, y posteriormente se enfrió con agitación a temperatura ambiente (RT).

Disolución de trabajo de PAHBAH: se prepararon tres disoluciones: 1) hidróxido sódico 0,5 M (NaOH): 10,0 de hidróxido sódico en 500 mL de agua desionizada; 2) HCl 0,5 M: 20,8 mL de HCl al 37% en 500 mL de agua desionizada;

3) disolución de reserva de PAHBAH al 5%: se disolvieron 25,0 g de PAHBAH (4-hidroxibenzhidrazida, Sigma H9882) en 500 mL de HCl 0,5 M. La disolución se protegió frente a la luz y se almacenó a 4°C. Justo antes de su uso, la disolución de trabajo de PAHBAH se preparó diluyendo la disolución de reserva de PAHBAH cinco veces con NaOH 0,5 M.

5 *Procedimiento:*

Todas las diluciones fueron preparadas con un robot dispensador Biomek (Beckman Coulter, EE.UU.) en MTPs (placa de reserva de ensayo y placa de ensayo: microplaca de poliestireno de 96 pocillos Clear, Corning, Cat. No. 9017; placa de PCR: VWR, Eu. Cat. No. 211-0297; placa de lectura: Kisker Biotech, Cat. No. G080-F).

- 10 1. Se diluyeron 3 µL de muestra de enzima (concentración que oscila entre 40-65 µg/mL) con 147 µL de NaAc 100 mM, pH 5,0, tampón de BSA al 0,1% en la placa de reserva de ensayo.
2. Se mezclaron 25 µL de muestra de la placa de reserva de ensayo con 150 µL de sustrato WE-AX en la placa de ensayo.
3. La placa de ensayo se incubó a 30°C y con una agitación de 1150 rpm durante 15 minutos en un agitador iEMS (ThermoScientific).
- 15 4. Tras finalizar la incubación, se mezclaron 45,4 µL de mezcla de reacción de la placa de ensayo con 135 µL de disolución de trabajo de PAHBAH en una placa de PCR.
5. La placa de PCR se incubó en una máquina de PCR (Tetrad 2, peltier thermo cycler, Bio-Rad) a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se enfrió a 20°C durante 10 segundos.
- 20 6. Se transfirieron 100 µL de muestra a una placa de lectura y la placa se leyó a 410 nm en un lector de microplaca (Molecular Devices).

La actividad de todas las xilanasas sintéticas se calculó como la media de tres réplicas restando un blanco que incluye NaAc 100 mM, pH 5,0, tampón de BSA al 0,1% en lugar de enzima.

Ensayo de termoestabilidad

Tampones y reactivos:

- 25 Tween 80 al 1%: se disolvió 1 g de Tween 80 (Sigma P-8074) con 9 mL de tampón MES, pH 6,0, y posteriormente se diluyó adicionalmente 10 veces con tampón MES, pH 6.
- Tampón MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 al 0,00125%: tampón MES 25 mM, pH 6,0: se disolvieron 4,88 g de MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) en 800 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 6,0 con NaOH. Se añadieron 1,25 mL de Tween 80 al 1% seguido de la adición de agua desionizada hasta 1000 mL.

30 *Procedimiento:*

Se midió la termoestabilidad de la xilanasas sintéticas incubando las xilanasas sintéticas a una concentración de proteína de aproximadamente 1 µg/mL (rango: 0,8-1,3 µg/mL) en tampón MES 25 mM, Tween 80 al 0,00125%, pH 6,0 durante 10 minutos a temperatura elevada. Tras finalizar la incubación, se midió la actividad residual correspondiente a las xilanasas sintéticas como se ha descrito en el Ensayo de Actividad (etapas 2-6).

- 35 La actividad de cada xilanasas sintética se calculó como la media de tres réplicas restando un blanco que incluía tampón MES 25 mM, Tween 80 al 0,00125%, pH 6,0, en lugar de enzima. La actividad residual se calcula como la ratio entre la actividad medida para la muestra tratada con calor y la actividad medida para una muestra idéntica, que no hubiera sido incubada a temperatura elevada.

Ensayo de resistencia a pepsina

- 40 La capacidad de las xilanasas sintéticas para soportar la degradación de pepsina fue evaluada a 40°C en una disolución tamponada a pH 3,5.

La capacidad de las xilanasas sintéticas para soportar la degradación de pepsina se midió incubando las xilanasas sintéticas en tampón de glicina 100 mM, pH 3,5, que contenía 0,2 g/L de pepsina durante 2 horas a 40°C y 1150 rpm en un agitador iEMS (Thermo Scientific). Al finalizar la incubación, se midió la actividad residual correspondiente a las xilanasas sintéticas como se describe en el Ensayo de Actividad (etapas 2-6).

- 45

Tampones y reactivos:

Tampón de glicina 100 mM, pH 3,5: se disolvieron 7,52 g de glicina en 800 mL de agua desionizada y se ajustó el pH hasta un pH 3,5 con HCl. Posteriormente se añadió agua desionizada hasta 1000 mL. Disolución de pepsina de 0,2 mg/mL: se disolvieron 0,2 g de pepsina (Sigma, P-7000) en 1000 mL de tampón de glicina 100 mM, pH 3,5.

La actividad de cada xilanasa sintética se calculó como la media de tres réplicas restando un blanco que incluía disolución de pepsina a 0,2 mg/mL en lugar de enzima. La actividad residual se calcula como la ratio entre la actividad medida para la muestra tratada con pepsina y la actividad medida en el ensayo de actividad con muestras no tratadas.

Ensayo de solubilización

5 *Tampones y reactivos:*

Tampón MES 100 mM, pH 6,0: se disolvieron 19,52 g de MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico) en 800 mL de agua desionizada y el pH se ajustó a 6,0 con NaOH. Posteriormente, se añadió agua desionizada hasta 1000 mL.

10 Disolución de sustrato de DDGS de maíz, 10%: se hidrató cDDGS con tamaño de partícula <212 µm en tampón MES 100 mM pH 6,0 agitando 15 minutos a 600 rpm. Inmediatamente después de finalizar la agitación, se ajustó el pH debido a una caída del pH producida por residuos ácidos en el cDDGS. Se transfirieron 190 µL/pocillo a las placas de sustrato, que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Procedimiento:

15 Todas las diluciones se prepararon con un robot dispensador Biomek (Beckman Coulter, EE.UU.), en MTPs (placa de sustrato y placa de recolección: microplaca de poliestireno de 96 pocillos Clear, Corning, Cat. No. 9017; placa de filtración: membrana de PVDF de 0,2 µm, Corning, Cat. No. 3504; placa de pocillo de media profundidad: placa de almacenamiento cuadrada de 1,2 mL de perfil bajo, Cat. No. AB-1127, Thermo Scientific.

1. Se añadieron 10 µL de muestra de enzima (concentración aparente de 150 µg/mL) a las placas de sustrato prefabricadas.
2. Incubación en iEMS a 40°C durante 240 minutos.
- 20 3. Se transfirieron 170 µL de muestra de la placa de sustrato incubada a una placa de filtración.
4. Las placas de filtración se colocaron en la parte superior de una placa de recolección y se centrifugaron durante 10 minutos a 1666xg.
5. Las placas de recolección se almacenaron a -20°C antes de su análisis.
- 25 6. Se diluyeron 100 µL de la placa de recolección con 900 µL de agua Milli Q en una placa de pocillo de profundidad media y se mezclaron durante 2 minutos en una tabla de agitación antes de transferirse al aparato Skalar.

Cuantificación de pentosanos

30 La cantidad total de azúcares C5 (pentosanos) puesta en disolución se midió usando un aparato de inyección de flujo continuo (sistema SKALAR) según el método descrito por Rouau & Surget (1994, Carbohydrate Polymers, 24, 123-132). Los sobrenadantes fueron tratados con una mezcla de CH₃COOH y HCl para hidrolizar polisacáridos en monoazúcares. Se añadió floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) para reaccionar con las monopentosas y las monohexosas para formar un complejo coloreado. Midiendo la absorbancia a 550 nm con 510 nm como longitud de onda de referencia, se calculó la concentración de pentosa en disolución usando una curva de calibrado de xilosa (50-400 µg de xilosa/mL). Al contrario que el complejo pentosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo hexosa-floroglucinol fue constante en estas longitudes de onda. Se añadió glucosa (0,3%) a la disolución de floroglucinol para crear una señal de glucosa constante y para asegurar adicionalmente que no hay interferencias de azúcares de hexosa.

40 Los resultados se presentan como índice de desempeño (PI), que se calculó como la ratio entre los valores tras incubación de cDDGS respectivamente con y sin adición de la xilanasa sintética: (cantidad total de azúcares C5 en disolución tras incubación con xilanasa sintética) / (cantidad total de azúcares C5 en disolución tras incubación sin enzima presente).

Estabilidad en el peletizado

45 Se llevaron a cabo ensayos de peletización a escala completa en el Instituto Tecnológico de Kolding, Dinamarca. Cada xilanasa fue formulada en trigo y mezclada en una mezcla de pienso de maíz/soja (61,1% de maíz, 31,52% de soja Hipro 48, 4,00% de aceite de soja, 0,40% de bicarbonato sódico, 0,25% de vitaminas/minerales de Leghennen, 0,20% de DL-metionina, 1,46% de fosfato dicálcico, 1,16% de caliza).

50 Se incluyó xilanasa para alcanzar un objetivo final de 20 000 XU/kg de pienso. Se preparó una premezcla mezclando las xilanasas formuladas en trigo en 10 kg de mezcla de pienso de maíz/soja y se mezcló durante 10 minutos. A continuación se añadió la premezcla a 110 kg de pienso y se mezcló durante 10 minutos antes del acondicionamiento. El pienso que comprendía la enzima se acondicionó durante 30 segundos a 90°C antes del peletizado. El término "acondicionamiento" tal como se usa en la presente memoria significa mezclar la mezcla pienso/enzima y tratarla con vapor seco para alcanzar una temperatura objetivo de 90°C después de 30 segundos.

ES 2 776 383 T3

El acondicionamiento se llevó a cabo colocando la mezcla pienso/enzima en un mezclador en cascada, a saber, un mezclador KAHL, longitud 130 cm, diámetro 30 cm, velocidad 155 rpm).

El tiempo de residencia para 300 kg/h es aproximadamente de 30 segundos, calculado como se indica a continuación:

Capacidad: 300 kg/h – 83,3 g/s

5 Llenado medido en el mezclador en cascada: 2500 g

Tiempo de residencia en el mezclador en cascada: $2500 \text{ g} / 83,3 \text{ g/s} = 30 \text{ s}$

En un lateral de mezclado en cascada se puede montar un colector con un descargador de agua y 3 válvulas de vapor, desde las cuales el vapor puede ser dirigido a la harina (por ejemplo, mezcla de pienso) o a la mezcla de pienso/enzima.

10 El vapor en este sistema puede venir proporcionado por una caldera de alta presión, por ejemplo una caldera Dan Stoker, capacidad máxima 400 kg de vapor/h. Se pueden realizar pruebas con una sobrepresión de 2 atm y el vapor puede ser dirigido a una válvula de reducción, que controla la adición de vapor al mezclador en cascada. Las tres válvulas del colector pueden usarse para un ajuste fino de la temperatura deseada para la harina (por ejemplo mezcla de pienso) o la mezcla de pienso/enzima. Añadiendo 1% de vapor a la harina (por ejemplo mezcla de pienso) o a la mezcla de pienso/enzima la temperatura aumenta en 14°C.

15 Tras el acondicionamiento, la mezcla pienso/enzima puede conformarse en pelets. Los pelets pueden conformarse en una prensa de pelets Simon Heesen con un troquel de $\varnothing 3 \text{ mm} \times 35 \text{ mm}$. La capacidad se fija en 300 kg/h y se ajusta al tornillo de dosificación. La harina/premezcla se calienta hasta la temperatura objetivo entre 65 y 95°C con vapor en el mezclador en cascada. La cantidad de vapor puede regularse mediante una válvula de reducción de la presión y un colector. Para cada nivel de temperatura, la primera toma de muestra se realiza cuando la operación se ha establecido después de 8-10 minutos del peletizado.

20 La prensa de pelets puede ser una Simon Heesen, tipo trabajo (monorrodillo) con un motor de 7,5 kW. Diámetro interno del troquel: 173 mm, altura del rodillo de prensa: 50 mm, diámetro del rodillo de prensa: 140 mm. Prensa de peletizado: 500 rpm y capacidad nominal: 300 kg/h.

25 Se pueden tomar muestras después de la prensa de peletizado. Son enfriadas, por ejemplo en una caja de enfriamiento particionada con fondo perforado, ventilador: 1500 m³ de aire/h.

30 La mezcla de pienso que contiene xilanasa (harina) y los pelets de pienso resultantes son molidos usando un molino de laboratorio Perten, antes de analizar la actividad de xilanasa de las muestras usando arabinoxilano reticulado con azurina procedente de trigo como sustrato. Se mezclan 5,0 g de muestra molida con 50 mL de tampón McIlvaine, pH 5,0 y se agita en un agitador magnético durante 10 minutos. El extracto se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio. Se mezclan 100 μL de extracto con 400 μL de tampón McIlvaine, pH 5,0 y se equilibra a 50°C durante 2 minutos. Se añade un comprimido de 60 mg de Xylazyme (Megazyme, Irlanda) para iniciar la reacción y las muestras se incuban a 50°C durante 60 minutos antes de parar la reacción añadiendo 5 mL de tris(hidroximetil)aminometano al 2% (Sigma, T-1503). La disolución se mezcla usando un vortex, se deja reposar durante 5 minutos y se mezcla de nuevo antes de centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos. Se mide la absorbancia del sobrenadante a 590 nm. Todas las muestras se miden por duplicado.

40 Se cuantifica la actividad de xilanasa usando una curva de calibrado de xilanasa preparada en una pulpa que actúa de blanco (sin enzima) y pienso de 90°C. El trigo formulado con xilanasa SynXyn92 fue extraído durante 10 minutos en tampón McIlvaine, pH 5,0 para obtener una concentración de 160 U/mL. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio y a continuación se añadieron 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 μL de extracto a 5,0 g de muestras de pulpa de blanco molida y pienso a 90°C. La actividad de xilanasa de estas muestras de calibrado se midió como se describe en el método de extracto anterior.

La actividad para la muestra de harina que comprende la xilanasa se fija en 100% y se calcula la actividad residual de la xilanasa sintética en el pelet de pienso acondicionado a 90°C referida a ella.

45 Resultados

50 Las xilanasas sintéticas incluidas en la presente memoria son buenas en la degradación *in vitro* de WU-AX (arabinoxilano no extraíble en agua) procedente de cDDGS, presentan actividades específicas aceptables a pH 5, son termoestables y son resistentes frente a la degradación de pepsina a pH 3,5 (con una actividad residual de al menos 70% tras 2 horas de incubación). La estabilidad durante el procesado de pienso se ha determinado para las enzimas sintéticas designadas en la presente memoria como synXyn92 y la estabilidad durante el procesado de pienso se ha considerado elevada (con una actividad residual de al menos 80% para el tratamiento a 90°C).

Tabla 2: Actividades residuales tras 10 minutos de incubación a las temperaturas seleccionadas (61°C, 65°C o 71°C), actividades residuales tras incubaciones de 2 h en presencia de pepsina y PI correspondiente a solubilización de pentosano correspondiente a las xilanasas sintéticas enumeradas en la presente memoria. Las xilanasas sintéticas con PI superior a 1,5 se consideraron capaces de degradar WU-AX de cDDGS.

Nombre de muestra	Termoestabilidad. Actividad residual. Temperatura de incubación: 61°C	Termoestabilidad. Actividad residual. Temperatura de incubación: 65°C	Termoestabilidad. Actividad residual. Temperatura de incubación: 71°C	Resistencia a pepsina. Actividad residual	PI de solubilización de pentosano referido al blanco
SYNXYN85	1,03	1,02		1,06	1,5
SYNXYN92	1,00	1,00		1,08	1,8
SYNXYN89	1,01	0,88		1,05	1,7
SYNXYN72	0,99	0,68		1,05	1,7
SYNXYN80	0,95	0,65		0,98	1,7
SYNXYN93			0,99	1,13	

5 Tabla 3: muestra la identidad de secuencia en un alineamiento por pares expresado como porcentaje. Los porcentajes de identidad se calcularon usando el paquete de software Indonesia, que también se usó para la preparación de alineamientos de secuencia. Los porcentajes de identidad se calcularon dividiendo el número de aminoácidos idénticos por el número de aminoácidos correspondientes al polipéptido más corto.

	Identidad con SynXyn92 SEQ ID No 1 (%)
SynXyn72	89
SynXyn80	92
SynXyn85	90
SynXyn89	94
SynXyn92	100
SynXyn93	99

10 La estabilidad durante el procesado en la forma de estabilidad durante el peletizado de pienso se determinó usando un procedimiento estándar en el Instituto Tecnológico Danés y se describe en la parte de estabilidad durante el peletizado de la sección de materiales y métodos. La actividad residual después de la peletización fue del 84% para la SynXyn92. Una recuperación del 80% después del peletizado podría considerarse una recuperación total.

15 Las secuencias sintéticas designadas en la presente memoria como SynXyn 92, SynXyn85, SynXyn89, SynXyn72, SynXyn80 y SynXyn93 también proporciona una respuesta positiva cuando se evalúan en el Ensayo de Actividad. Los polipéptidos que dan como resultado una DO(410nm) >0,7 cuando se analizan en las condiciones mencionadas en el Ensayo de Actividad se considera que presenta actividad de xilanasas.

Ejemplo 3 – Reducción de viscosidad en trigo

20 En la industria de alcohol combustible europea, los granos pequeños como el trigo, la cebada y el centeno son materias primas habituales, al contrario que en los EE.UU. donde se usa principalmente maíz. Dichos granos pequeños contienen, junto con el almidón, niveles elevados de polímeros de tipo polisacáridos de naturaleza no almidonada (NSP, del inglés “non-starch polysaccharide”), como la celulosa, el beta-glucano y la hemicelulosa.

La ratio en la que los diferentes NSPs están representados difiere de una materia prima a otra. La Tabla 1 muestra las diferentes cantidades de NSPs en el trigo, la cebada y el centeno, en comparación con algunas otras materias primas.

Tabla 1: Polisacáridos no almidón presentes en diferentes materias primas (g kg⁻¹ de materia seca)^{1,2}

	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 ³ soluble y no soluble	75	89-99	116-136	144	114	150	113
NSP total	97	107-119	132-152	186	124	232	116

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

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

³ Polisacáridos No Celulósicos: pentosanos, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas

Los NSPs proporcionan una viscosidad elevada en las pulpas de grano. Una viscosidad elevada tiene un impacto negativo en la producción de etanol, ya que limita la concentración de sólidos que puede usarse durante la pulpación, y reduce la eficiencia energética del proceso. Adicionalmente, las hemicelulosas residuales presentes a lo largo del proceso pueden contribuir a formación de depósitos en los intercambiadores de calor y el equipamiento de destilación. El mayor impacto de una viscosidad elevada se observa cuando una pulpa es enfriada hasta la temperatura de fermentación (32°C). Esto explica que la viscosidad necesite ser reducida en el proceso en un punto previo a la etapa de enfriamiento. Dependiendo del proceso usado, se necesitan enzimas que operen a 60°C y/o 85°C.

Las enzimas reductoras de la viscosidad pueden añadirse en diferentes etapas del proceso de producción de etanol: en la mezcla y/o sacarificación/fermentación. Preferiblemente, las enzimas se añaden durante el mezclado para romper la viscosidad inicial.

Los beneficios de usar enzimas reductoras de la viscosidad en el proceso de producción de etanol son múltiples:

- Se puede usar una pulpa de mayor sustancia seca en el proceso.
- Se pueden obtener mayores contenidos de sólido en el jarabe final.
- Mejor transferencia de calor, menor requerimiento energético.
- Ensuciamiento reducido del evaporador que conlleva menores costes de limpieza.
- Aumento de los rendimientos finales de etanol.
- Mejor calidad de DDGS (sub-producto)

Métodos

Se usó un equipo Rapid Visco Analyzer (RVA 4500) de Perten Instruments para medir los perfiles de viscosidad de una pulpa de trigo. Dicha pulpa de trigo se preparó según el siguiente protocolo:

Preparar 60 gramos de DS al 30% (34,65% "tal cual") de suspensión de trigo (para análisis simultáneos en dos RVA's) como se indica a continuación:

- Pesar 20,80 gramos de trigo.
- En un vaso de precipitados de 100 mL, pesar 39,20 gramos de agua de grifo y añadir 137 µL de H₂SO₄ 4N.
- Añadir el trigo a agua y agitar durante 5 minutos a velocidad máxima (aproximadamente 500 rpm) con un agitador de cabeza.
- Transferir 25,0 g de suspensión a una copa de RVA, añadir enzimas diluidas 1:50 y comenzar el análisis de RVA (comprobar si el pH inicial está alrededor de 5,3).
- Comprobar el pH al final del análisis de RVA (5,6-5,7).

En cada experimento (25 gramos de suspensión), la xilanasas se dosificó a 25 µg de proteína (para 8,66 g de trigo "tal cual"), correspondiente a 2,9 µg de proteína/g de trigo "tal cual". Se dosificó SPEZYME® CL a 0,15 kg/MT de trigo "tal cual" (2,2 AAU/g "tal cual" o 2,6 AAU/g de DS).

Se simuló en el RVA una licuefacción de trigo estándar. Se llevó a cabo un pretratamiento durante 20 minutos a 60°C, seguido de una etapa de licuefacción durante 30 minutos a 85°C. Tras el pretratamiento y la licuefacción, la suspensión se enfrió hasta 32°C, para determinar la viscosidad en condiciones de fermentación. El pH de la licuefacción se mantuvo entre 5,3-5,7.

En este experimento, se comparó el desempeño de la SynXyn93 con una xilanasas conocida con propiedades reductoras de la viscosidad (control positivo).

	Viscosidad (mPa*s)		
	Blanco (n=2)	Enzima de control positivo	SynXyn93
Tras pretratamiento (1200 s de tiempo de proceso)	533 ± 16	224	592
Tras licuefacción (3120 s tras tiempo de proceso)	347 ± 16	130	167
A la temperatura de fermentación (3660 s de tiempo de proceso)	765 ± 20	275	341

Los datos se muestran en la Figura 16.

5 Estos datos muestran que la enzima SynXyn93 no presenta actividad durante la etapa de pretratamiento (60°C), pero se activa en la etapa de licuefacción (85°C). La reducción de viscosidad continúa durante la etapa de licuefacción a 85°C, lo que indica que la SynXyn93 presenta una actividad significativa a dicha temperatura elevada. Las viscosidades finales con la SynXyn93 son un 52-55% inferiores a las del blanco.

10 Se llevó a cabo un experimento adicional en el que se añadió enzima xilanasa a la temperatura de licuefacción (85°C), en lugar de al principio del proceso. Esto se realizó para demostrar la termoestabilidad mejorada de la SynXyn93. Para estos experimentos, se usó un husillo especial con un puerto de inyección, que permitía la adición de la enzima durante el ensayo de RVA. El husillo se detuvo durante 1 minuto cuando se alcanzó la temperatura de licuefacción (85°C) (22 minutos de tiempo de proceso) y se añadió la enzima xilanasa. El puerto de inyección se lavó con 50 µL de agua demi y se reinició la rotación del husillo a los 23 minutos de tiempo de proceso. En estos experimentos, se añadió SPEZYME® CL al principio del proceso.

	Viscosidad (mPa*s)		
	Blanco (n=2)	Enzima de control positivo	SynXyn93
Tras pretratamiento (1200 s de tiempo de proceso)	533 ± 16	603 *	552 *
Tras licuefacción (3120 s tras tiempo de proceso)	347 ± 16	209	159
A la temperatura de fermentación (3660 s de tiempo de proceso)	765 ± 20	449	308
* No se añadió xilanasa en el pretratamiento, por lo que se espera el mismo valor que en el blanco.			

Los datos se muestran en la Figura 17.

15 Estos datos confirman la termoestabilidad aumentada de la SynXyn93 en comparación con la enzima de control positivo. La SynXyn93 muestra una reducción de la viscosidad del 54-60% en comparación con el blanco, mientras que la enzima de control positivo solo es del 40-41%. Para la SynXyn93 no existe diferencia en el desempeño cuando se añade al principio del proceso o a 85°C. La enzima de control positivo, por otra parte, se afectada considerablemente cuando se añade a 85°C en lugar de al principio del proceso: la reducción de viscosidad (comparada con el blanco) disminuye desde el 63% al 41%. Por tanto, en este caso la viscosidad final con SynXyn93 es más baja que con la enzima de control positivo.

20

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado que presenta actividad de xilanasas, seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de al menos 89% con la SEQ ID NO: 1;
 - 5 (b) un polipéptido codificado por un nucleótido que tiene una identidad de al menos 89% con la SEQ ID NO: 2; o
 - (c) un fragmento de un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o codificado por la secuencia de polinucleótido de la SEQ ID NO: 2, fragmento que es al menos el 60% de la secuencia de longitud completa de la SEQ ID NO: 1 y que presenta actividad de xilanasas.
2. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde el polipéptido:
 - 10 (a) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11; y/o
 - (b) consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 11; y/o
 - 15 (c) está codificado por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12; y/o
 - (d) es una endo-1,4-β-xilanasas; y/o
 - (e) presenta al menos un 50% de actividad residual de actividad de xilanasas tras incubación a 65°C durante 10 minutos a pH 6 y/o presenta al menos un 80% de actividad residual de actividad de xilanasas tras incubación a 61°C durante 10 minutos a pH 6; y/o
 - 20 (f) presenta una actividad residual de al menos 70% cuando se incuba con 0,2 mg/mL de pepsina en una disolución tamponada a pH 3,5 durante dos horas a una temperatura de 40°C; y/o
 - (g) presenta al menos un 60% (preferiblemente al menos 80%) de actividad residual de actividad de xilanasas después de que un pienso que comprende el polipéptido ha sido tratado con vapor seco para alcanzar una temperatura objetivo de 90°C después de 30 segundos.
- 25 3. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, preferiblemente en donde el polinucleótido comprende un polinucleótido que tiene una identidad de al menos 89% con la SEQ ID NO: 2; o un polinucleótido aislado que difiere de la SEQ ID No. 2 debido a la degeneración del código genético, o en donde el polinucleótido comprende un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12, o un polinucleótido aislado que difiere de la SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 12 debido a una degeneración del código genético.
- 30 4. Una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido de la reivindicación 3 ligado operativamente a una o más secuencias de control que dirijan la producción del polipéptido en un hospedante de expresión, preferiblemente dicha construcción de ácido nucleico está comprendida en un vector de expresión recombinante.
- 35 5. Un método para producir el polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende (a) cultivar una célula hospedante que comprende una construcción de ácido nucleico según la reivindicación 4 en condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido, donde preferiblemente el polipéptido es recuperado, y/o aislado y/o purificado.
- 40 6. Una célula hospedante recombinante que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, el polinucleótido de la reivindicación 3, la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 4 o el vector de la reivindicación 4.
7. Una composición o una composición de aditivo para pienso que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
- 45 8. Una premezcla que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la composición enzimática según la reivindicación 7, o una composición de aditivo para pienso según la composición 7, y al menos una vitamina y/o al menos un mineral.
9. La composición de aditivo para pienso según la reivindicación 7 o la premezcla según la reivindicación 8, que además comprende una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que comprende 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 (por ejemplo subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina
- 50

proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)) y/o una fitasa (por ejemplo una 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.38)).

5 10. Un pienso (o alimento tipo pienso) que comprende un polipéptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la composición enzimática según la reivindicación 7, o una composición de aditivo para pienso según la reivindicación 7 o la reivindicación 9, o una premezcla según la reivindicación 8 o la reivindicación 9.

10 11. Un método para degradar material que contiene arabinoxilano en un material que contiene xilano, que comprende mezclar dicho material que contiene xilano con un polipéptido según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la composición enzimática según la reivindicación 7, o una composición de aditivo para pienso según la reivindicación 7 o la reivindicación 9, o una premezcla según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, preferiblemente el material que contiene arabinoxilano es un componente de pienso.

12. El método según la reivindicación 11 en el que:

(a) el arabinoxilano es arabinoxilano insoluble (AXinsol); y/o

15 (b) el material que contiene xilano se selecciona de uno o más del grupo que consiste en: un pienso; un componente para pienso; un material basado en grano; una pulpa; un mosto; una malta; cebada malteada; un adjunto, una pulpa de cebada; y una harina de cereal, preferiblemente donde el pienso o componente de pienso comprende o consiste en maíz, DDGS, tal como cDDGS, trigo, salvado de trigo, o una combinación de los mismos, en donde de la forma más preferible el pienso es un pienso basado en maíz; y/o

20 (c) el polipéptido se usa en combinación con 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), liqenasas (E.C. 3.2.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), aciltransferasas de lípidos (clasificadas generalmente como E.C. 2.3.1.x), fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), fitasas (por ejemplo 6-fitasa (E.C. 3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.3.8), amilasas, alfa-amilasas (E.C. 3.2.1.1), otras xilanasas (E.C. 3.2.1.8, E.C. 3.2.1.32, E.C. 3.2.1.37, E.C. 3.2.1.72, E.C. 3.2.1.136), glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3), hemicelulasas, proteasas (por ejemplo subtilisina (E.C. 3.4.21.62) o una bacilolisina (E.C. 3.4.24.28) o una serina proteasa alcalina (E.C. 3.4.21.x) o una queratinasa (E.C. 3.4.x.x)), enzimas desramificantes, cutinasas, estearasas y/o mannanasas (por ejemplo una β -mannanasa (E.C. 3.2.1.78)).

30 13. Un método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprende administrar a un sujeto a través del pienso la composición enzimática según la reivindicación 7, o una composición de aditivo para pienso según la reivindicación 7 o la reivindicación 9, o una premezcla según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, o un pienso según la reivindicación 10.

14. El método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde el método es, o es parte de: un proceso de separación gluten de trigo-almidón; o un proceso de producción de biocombustible o bioproductos; o un proceso de malteado o de elaboración de cerveza.

FIGURA 1

SEQ ID No. 1

>Traducción de synXyn92 (24aa - 325aa) 302 aa

QAAASINNAFKAHGKKYFGTCADQDRTLTPKNAAIKADFGQLTPENSMKWDATEDPSQGFNFGGADYLV
NFAKQNGKLI RGH TLVWHSQ LPSWVQNINDKNTLT KVMKNHITTVMSRYK GK IYAWDVVNEIFNEDGTLR
NSVFYNVLGEDFVRIAFETARAADPN AKLYINDYNLDSANYAKTKGMVSHVKKWIAEGIPIDGIGSQTHL
GAGGGAGVAGALNALAAAGVSEVAITELDIAGASSNDYVNVVKACLNEPKCVGITVWGVSDKDSWRSDDN
PLLFDSNYKPKAAYNAIIDALR

FIGURA 2

SEQ ID No. 2

> synXyn92 (121pb - 1098pb, directo) 978pb

ATGAAGCTCAGCTCGTTCCCTACACCGCCAGCCTCGTCGCTGCCATCCCTACCGCTATCGAGCCCCGAC
AGGCTGCTGCCAGCATCAACAACGCCTTCAAGGCCACGGCAAGAAGTACTTCGGCACTTGCGCCGACCA
GGACACGCTCACCAACCCCAAGAACGCCGCCATCATCAAGGCCGACTTCGGCCAGCTCACCCCGAGAAC
AGCATGAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTTGGCGGCGCTGACTACCTCGTCA
ACTTCGCCAAGCAGAACGGCAAGCTCATCCGCGGCCACACCCTCGTCTGGCACAGCCAGCTCCCTAGCTG
GGTCCAGAACATCAACGACAAGAACACCCTGACCAAGGTCATGAAGAACCACATCACCACCGTCATGAGC
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCAACGAGGACGGCACCCCTCCGCA
ACAGCGTCTTTTACAACGTCCTGGGCGAGGACTTCGTCCGCATTGCCCTTCGAGACTGCCCGAGCCGCGCA
CCCCAACGCTAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACAGCGCCAACTACGCCAAGACCAAGGGCATG
GTCAGCCACGTCAGAAGTGGATCGCCGAGGGCATCCCCATCGACGGCATCGGCAGCCAGACTCACCTTG
GCGCTGGCGGCGGCGCTGGCGTTGCTGGCGCTCTCAACGCTCTGGCCGCTGCCGGCGTCAGCGAGGTGCG
CATCACCGAGCTGGACATTGCTGGCGCTAGCAGCAACGACTACGTCAACGTCGTCAAGGCCTGCCTCAAC
GAGCCCAAGTGCCTCGGCATCACCGTCTGGGGCGTCAGCGACAAGGACAGCTGGCGCAGCGACGACAACC
CCCTCCTCTTCGACTCCAAC TACAAGCCCAAGGCCGCTACAACGCCATCATCGACGCCCTCCGCTAA

FIGURA 3

SEQ ID No. 3

>Traducción de synXyn85 (24aa - 327 aa) 304aa

QAAASINNAFKAHGKRYFGTCADQDTLSNSQNAAIKADFGQLTPENSMKWDATEPSQGKFNFAGADYLV
NYAKQNGKLVVRGHTLVWHSQLPSWVSAITDKNTLTSVMKNHITTVMSRYKGQIYAWDVVNEIFNEDGTLR
NSVFYNVLGEDFVRIAFETARAVDPDAKLYINDYNLDSANYAKTQGMVSHVKKWLAAGIPIDGIGSQTHL
SPGGLSSSGVAGALTALASTGVSEVAITELDIAGASSNDYVNVVKACLDVPKCVGITVWGVSDKDSWRSD
DSPLLFDSNYQPKAAYNAIIDALS

FIGURA 4

SEQ ID No. 4

> synXyn85 (121pb - 1104pb, directo) 984pb

ATGAAGCTCAGCTCGTTCCTCTACACCGCCAGCCTCGTCGCCGCTATCCCTACCGCTATCGAGCCCCGAC
AGGCCGCTGCCAGCATCAACAACGCCTTCAAGGCCACGGCAAGAAGTACTTCGGCAGCTTGCGCCGACCA
GGACACCCCTCAGCAACAGCCAGAACGCCGCCATCATCAAGGCCGACTTCGGCCAGCTCACCCCGAGAAC
AGCATGAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGCTGGCGCCGACTACCTCGTCA
ACTACGCTAAGCAGAACGGCAAGCTCGTCCGCGGCCACACCCTCGTCTGGCACAGCCAGCTCCCCTCCTG
GGTCAGCGCCATCACCGACAAGAACCCTCACCAGCGTCATGAAGAACCACATCACCCACCGTCATGAGC
CGCTACAAGGGCCAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCAACGAGGACGGCACCCCTCCGCA
ACTCCGTCTTTTACAACGTCCCTCGGCCGAGGACTTCGTCCGCATTGCCTTCGAGACTGCCCGAGCCGTCGA
CCCCGACGCCAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACAGCGCCAACCTACGCCAAGACCCAGGGCATG
GTCAGCCACGTCAAGAAGTGGCTCGCTGCCGGCATCCCCATCGACGGCATCGGCAGCCAGACCCACCTCA
GCCCTGGCGGCCCTCAGCAGCAGCGGCGTGGTGGCGCTCTCACCGCCCTCGCCTCTACCGGCGTCAGCGA
GGTCGCCATTACCGAGCTGGACATTGCTGGCGCTAGCAGCAACGACTACGTCAACGTCTCAAGGCCTGC
CTCGACGTCCCCAAGTGGCTCGGCATCACCGTCTGGGGCGTCAGCGACAAGGACAGCTGGCGCAGCGACG
ACAGCCCCCTCCTCTTCGACTCCAACCTACCAGCCCAAGGCCGCTACAACGCCATCATCGACGCCCTCAG
CTAA

FIGURA 5

SEQ ID No. 5

>Traducción de synXyn89 (24aa - 327aa) 304aa

QAAASINNAFKAHGKKYFGTCADQGTLSNSKNAAI IKADFGQLTPENSMKWDATEPSQGKFNFEGGADYLV
NYAKQNGKLI RGH TLVWHSQLPSWVQDITDKNTLTSVMKNHITTVMSRYKGGKIYAWDVVNEIFNEDGTLR
NSVFYINVLGEDFVRIAFETARAADPDAKLYIINDYNLDSANYAKTKGMVSHVKKWIAAGIPI DGI G SQTHL
GAGGLSGSGVAGALNALASTGVSEVAITELDIAGASSNDYVNVVKACLNVPKCVGITVWGVSDKDSWRSD
DSPLLFDSNYQPKAAYNAIIDALS

FIGURA 6

SEQ ID No. 6

> synXyn89 (121pb - 1104pb, directo) 984pb

ATGAAGCTCAGCTCGTTCCCTCTACACCGCCAGCCTCGTCCGCGCTATCCCTACCGCCATCGAGCCCCGAC
AGGCCGCTGCCAGCATCAACAACGCCTTCAAGGCCACGGCAAGAAGTACTTCGGCACTTGGCCGACCA
GGGCACGCTCAGCAACAGCAAGAACCGCCGATCATCAAGGCCGACTTCGGCCAGCTCACCCCGAGAAC
AGCATGAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTTGGCGGCGCTGACTACCTCGTCA
ACTACGCTAAGCAGAACGGCAAGTCATCCGCGGCCACACCCTCGTCTGGCACAGCCAGTCCCGTCCG
GGTCCAGGACATCACCGACAAGAACACCCTCACCAGCGTCATGAAGAACCACATCACCCCGTTCATGAGC
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTC AACGAGATCTTCAACGAGGACGGCACCCCTCCGCA
ACTCCGCTCTTTTACAACGTCCTCGGCGAGGACTTCGTCGCGATTGCCTTCGAGACTGCCCGAGCCGCCGA
CCCCGACGCCAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACAGCGCCAACTACGCCAAGACCAAGGGCATG
GTCAGCCACGTC AAGAAGTGGATCGCTGCCGGCATCCCCATCGACGGCATCGGCAGCCAGACCCACCTCG
GCGCTGGCGGCCCTTCTGGCTCTGGCGTGGCTGGCGCCCTCAACGCCCTCGCCAGCACCGGCGTCAGCGA
GGTCGCCATCACCGAGCTGGACATTCCTGGCGCTAGCAGCAACGACTACGTC AACGTCGTC AAGGCCTGC
CTCAACGTC C CCAAGTGCCTCGGCATCACCGTCTGGGGCGTCAGCGACAAGGACAGCTGGCGCAGCGAGC
ACAGCCCCCTCCTCTTCGACTCCAACCTACCAGCCCAAGGCCGCTACAACGCCATCATCGACGCCCTCAG
CTAA

FIGURA 7

SEQ ID No. 7

>Traducción de synXyn72 (24aa - 324aa) 301 aa

QAAASINNAFKAKGKKYFGTCADQGTLSDESTNSAIKADFGQLTPENSMKWDATEPSQGFSGGADYLV
NYATSNGLIRGHTLVWHSQLPSWVQGITDKNTLTSVLKNHITVMNRYKGKIYAWDVVNEIFNEDGTLR
NSVFYINVLGEDFVRIAFETARAVIDPQAKLYINDYNLDSANYAKTKGMANHVKKWIAQGIPIIDGIGSQTHL
GAGSSGVKALNTLASSGVSEVAITELDIAGASSNDYVNVVKACLNVSKCVGITVWGVSDKDSWRSDDS
PLLFDSNYQPKAAYNAIINAL

FIGURA 8

SEQ ID No. 8

> synXyn72 (121pb - 1095pb, directo) 975pb

ATGAAGCTCAGCTCGTTCCTCTACACCGCCAGCCTCGTCGCCGCCATCCCTACCGCCATCGAGCCCCGAC
AGGCCGCTGCCAGCATCAACAACGCTTCAAGGCCAAGGGCAAGAAGTACTTCGGCACTTGCGCCGACCA
GGCAGGCTCAGCGACAGCACCAACAGCGCCATCATCAAGGCCGACTTCGGCCAGCTCACCCCGAGAAC
AGCATGAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGCCAGGGCAAGTTCAGCTTTGGCGGCGCTGACTACCTCGTCA
ACTACGCCACCAGCAACGGCAAGCTCATCCGGGCCACACCCTCGTCTGGCACAGCCAGCTCCCCGTCCTG
GGTCCAGGGCATCACCGACAAGAACCCTCACCAGCGTCCCTCAAGAACCACATCACCCACGTCATGAAC
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCAACGAGGATGGCACCCCTCCGCA
ACAGCGTCTTTTACAACGTCCTGGGCGAGGACTTCGTCCGCATTGCCTTCGAGACTGCCCGAGCCGTCGA
CCCCCAGGCCAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACAGCGCCAACCTACGCCAAGACCAAGGGCATG
GCCAACCACGTCAGAAGTGGATCGCCAGGGCATCCCCATCGACGGCATCGGCAGCCAGACCCACCTCG
GCGCTGGCGGCTCTAGCGGCGTCAAGGGCGCTCTCAACACCCCTCGCCAGCTCCGGCGTCAGCGAGGTCGC
CATCACCGAGCTGGACATTTGCTGGCGCCTCGAGCAACGACTACGTCAACGTCGTCAAGGCCTGCCCAAC
GTCAGCAAGTGGCTCGGCATCACCGTCTGGGGCGTCTCCGACAAGGACAGCTGGCGCAGCGACGACAGCC
CCCTCCTCTTCGACTCCAACCTACCAGCCCAAGGCCGCTACAACGCCATCATTACGCCCTCTAA

FIGURA 9

SEQ ID No. 9

>Traducción de synXyn80 (24aa - 325aa) 302aa

QAAASIDAKFKAHGKKYFGNIADQYTLTKNPKTAALIKADFGQLTPENSMKWDATEPSRCKFNFGGSDYL
VNFQKQNNKLI RGH TLVWHSQ LPSWVQNINDKNTLTQVMKNHITVMSRYKGIYAWDVVNEIFNEDGTL
RNSVFY NVLGEDFVR IAFETARAADPN AKLYINDYNLDSANYAKTKGMVSHVKKWIAEGIPIDGIGSQTH
LGAGGGAGVSGALNALATAGTKEVAITELDIAGASSTDYVNVVKACL NQPKCVGITVWGVSDKDSWRSDD
TPLLFDSNYPKPAYNAITDAL

FIGURA 10

SEQ ID No. 10

> synXyn80 (121pb - 1098pb, directo) 978pb

ATGAAGCTCAGCTCGTTCCTCTACACCGCCAGCCTCGTTCGCGCTATCCCTACCGCCATCGAGCCCCGAC
AGGCCGCTGCCAGCATCGACGCCAAGTTCAAGGCCACGGCAAGAAGTACTTCGGCAACATTGCCGACCA
GTACACGCTCACCAAGAACCCCAAGACCGCCGCCATCATCAAGGCCGACTTCGGCCAGCTCACCCCGAG
AACAGCATGAAGTGGGACGCCACCGAGCCAGCCGAGGCAAGTTCAACTTCGGCGGCAGCGACTACC TCG
TCAACTTCGCCAAGCAGAACAACAAGCTCATCCGCGGCCACACCCTCGTCTGGCACAGCCAGCTCCCGTC
CTGGGTCCAGAACATCAACGACAAGAACACCCTCACCCAGGTCATGAAGAACCACATCACCACCGTCA TG
AGCCGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCAACGAGGACGGCACCCCTCC
GCAACAGCGTCTTTTACAACGTCTGGGCGAGGACTTCGTCCGCATTGCCTTCGAGACTGCCCGAGCCGC
CGACCCCAACGCCAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACAGCGCCAAC TACGCCAAGACCAAGGGC
ATGGTCAGCCACGTC AAGAAGTGGATCGCCGAGGGCATCCCCATCGACGGCATCGGCTCTCAGACTCACC
TCGGCGCTGGCGCGCGCTGGCGTCTCTGGCGCTCTCAACGCCCTCGCCACC GCCGGCACCAAGGAGGT
CGCCATCACCGAGCTGGACATTGCTGGCGCTAGCAGCACCGACTACGTCAACGTCGTCAAGGCCTGCCTC
AACCAGCCCAAGTGCCTGGGCATCACCGTCTGGGGCGTCAGCGACAAGGACAGCTGGCGCAGCGACGACA
CCCCCTGCTGTTCGACAGCAACTACAACCCCAAGCCCGCCTACAACGCCATCACGGACGCCCTCTAA

FIGURA 11

SEQ ID No. 11

>Traducción de synXyn93

QAAASIDNAFKAHGKKYFGTCADQDTLTNPKNVAIIKADFGQLTPENSMKWDATEPSQGKFNFGGADYLV
NFAKQNGKLIRGHTLVWHGQLPSWVQNINDKNTLTKVMKNHITTVMSRYKGKIYAWDVVNEIFNEDGTLR
NSVFYNVLGEDFVRIAFETARAADPNKLYINDYNLDSANYAKTKGMVSHVKKWIAEGIPIDGIGSQTHL
GAGGGAGVAGALNALAAAGVSEVAITELDIAGASSNDYVNVVKACLNEPKCVGITVWGVSDKDSWRSDDN
PLLFDSNYKPKAAYNAIIDALR*

FIGURA 12

SEQ ID No. 12

>13AA22XC_synXyn93 (121pb - 1098pb, directo) 978 pb

ATGAAGCTCAGCTCGTTCCTCTACACCGCCAGCCTCGTTCGCTGCCATCCCTACCGCTATCGAGCCCCGAC
AGGCTGCTGCCAGCATCGACAACGCCTTCAAGGCCACGGCAAGAAGTACTTCGGCACTTGCGCCGACCA
GGACACGCTCACCAACCCCAAGAACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTCGGCCAGCTCACCCCCGAGAAC
AGCATGAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTTGGCGGGCTGACTACCTCGTCA
ACTTCGCCAAGCAGAACGGCAAGCTCATCCGCGCCACACCCTCGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTAGCTG
GGTCCAGAACATCAACGACAAGAACACCCTGACCAAGGTCATGAAGAACCACATCACCACCGTCATGAGC
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCAACGAGGACGGCACCCCTCCGCA
ACAGCGTCTTTTACAACGTCCTGGGCGAGGACTTCGTCCGCATTGCCTTCGAGACTGCCCGAGCCGCGGA
CCCCAACGCTAAGCTCTACATCAACGACTACAACCTCGACAGCGCCAACTACGCCAAGACCAAGGGCATG
GTCAGCCACGTCAAGAAGTGGATCGCCGAGGGCATCCCCATCGACGGCATCGGCAGCCAGACTCACCTTG
GCGTGGCGGGCGGCTGGCGTTGCTGGCGCTCTCAACGCTCTGGCCGCTGCCGGCGTCAGCGAGGTCGC
CATCACCGAGCTGGACATTGCTGGCGCTAGCAGCAACGACTACGTCAACGTCGTCAAGGCCTGCCTCAAC
GAGCCCAAGTGCCTCGGCATCACCGTCTGGGGCGTCAGCGACAAGGACAGCTGGCGCAGCGACGACAACC
CCCTCCTCTTCGACTCCAACATAAGCCCAAGGCCGCTACAACGCCATCATCGACGCCCTCCGCTAA

FIGURA 13

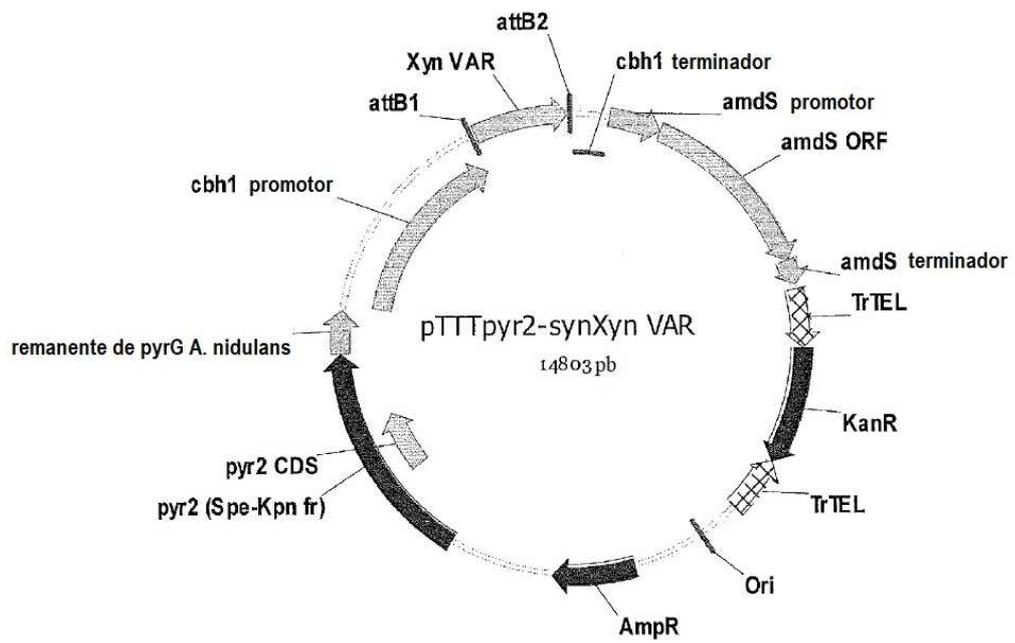


FIGURA 14

	10	20	30	40	50	60	
synXyn92	QAAASLNNAFNAHGKRYFGTCADQDDELT-NPKNAALPKADFGQLPEE NSMKWDATLPSQG						59
synXyn93	QAAASLNNAFNAHGKRYFGTCADQDDELT-NPKNVALPKADFGQLPEE NSMKWDATLPSQG						59
synXyn89	QAAASLNNAFNAHGKRYFGTCADQDDELT-NSKNAALPKADFGQLPEE NSMKWDATLPSQG						59
synXyn72	QAAASLNNAFNAHGKRYFGTCADQDDELT-DSINSALPKADFGQLPEE NSMKWDATLPSQG						59
synXyn80	QAAASLNNAFNAHGKRYFGTCADQDDELT-NPKNTALPKADFGQLPEE NSMKWDATLPSQG						60
synXyn85	QAAASLNNAFNAHGKRYFGTCADQDDELT-NSQNAALPKADFGQLPEE NSMKWDATLPSQG						59
	70	80	90	100	110	120	
synXyn92	LNNGADYLVFAKQNGELKGLHLYVHLSGLDPSWVONNNDKNTLTKMMSNIEGVMSR						119
synXyn93	LNNGADYLVFAKQNGELKGLHLYVHLSGLDPSWVONNNDKNTLTKMMSNIEGVMSR						119
synXyn89	LNNGADYLVFAKQNGELKGLHLYVHLSGLDPSWVONNNDKNTLTKMMSNIEGVMSR						119
synXyn72	LNNGADYLVFAKQNGELKGLHLYVHLSGLDPSWVONNNDKNTLTKMMSNIEGVMSR						119
synXyn80	LNNGADYLVFAKQNGELKGLHLYVHLSGLDPSWVONNNDKNTLTKMMSNIEGVMSR						120
synXyn85	LNNAAGADYLVFAKQNGELKGLHLYVHLSGLDPSWVONNNDKNTLTKMMSNIEGVMSR						119
	130	140	150	160	170	180	
synXyn92	KGLKYAWDVMNIEFNEDEGLRNSVFNVLGEDIIVRLAETARAVDPDAKLYINDYNLDSA						179
synXyn93	KGLKYAWDVMNIEFNEDEGLRNSVFNVLGEDIIVRLAETARAVDPDAKLYINDYNLDSA						179
synXyn89	KGLKYAWDVMNIEFNEDEGLRNSVFNVLGEDIIVRLAETARAVDPDAKLYINDYNLDSA						179
synXyn72	KGLKYAWDVMNIEFNEDEGLRNSVFNVLGEDIIVRLAETARAVDPDAKLYINDYNLDSA						179
synXyn80	KGLKYAWDVMNIEFNEDEGLRNSVFNVLGEDIIVRLAETARAVDPDAKLYINDYNLDSA						180
synXyn85	KGLKYAWDVMNIEFNEDEGLRNSVFNVLGEDIIVRLAETARAVDPDAKLYINDYNLDSA						179
	190	200	210	220	230	240	
synXyn92	NYAKIKGMVSEVKEWLAAGLPIDGIGSQTHLGAGG--GAGVAGATNAIAAAGVSEVAILE						237
synXyn93	NYAKIKGMVSEVKEWLAAGLPIDGIGSQTHLGAGG--GAGVAGATNAIAAAGVSEVAILE						237
synXyn89	NYAKIKGMVSEVKEWLAAGLPIDGIGSQTHLGAGGLSGSVAGATNAIAAAGVSEVAILE						239
synXyn72	NYAKIKGMVSEVKEWLAAGLPIDGIGSQTHLGAGG--SSGMKGANIAAAGVSEVAILE						237
synXyn80	NYAKIKGMVSEVKEWLAAGLPIDGIGSQTHLGAGG--GAGVSEVAILE						238
synXyn85	NYAKIKGMVSEVKEWLAAGLPIDGIGSQTHLSPGLSSSVAGATNAIAAAGVSEVAILE						239
	250	260	270	280	290	300	
synXyn92	LDIAGASNDYVNVKACLENPKCVGLIYVWGVSDKDSWRSDDNPELFDSDNYKPKAAAYNAI						297
synXyn93	LDIAGASNDYVNVKACLENPKCVGLIYVWGVSDKDSWRSDDNPELFDSDNYKPKAAAYNAI						297
synXyn89	LDIAGASNDYVNVKACLENVPKCVGLIYVWGVSDKDSWRSDDNPELFDSDNYKPKAAAYNAI						299
synXyn72	LDIAGASNDYVNVKACLENVSKCVGLIYVWGVSDKDSWRSDDNPELFDSDNYKPKAAAYNAI						297
synXyn80	LDIAGASNDYVNVKACLENPKCVGLIYVWGVSDKDSWRSDDNPELFDSDNYKPKAAAYNAI						298
synXyn85	LDIAGASNDYVNVKACLEDVPKCVGLIYVWGVSDKDSWRSDDNPELFDSDNYKPKAAAYNAI						299
	310						
synXyn92	IEDAIR						302
synXyn93	IEDAIR						302
synXyn89	IEDAIS						304
synXyn72	IEDAIR						301
synXyn80	IEDAIR						302
synXyn85	IEDAIS						304

FIGURA 15

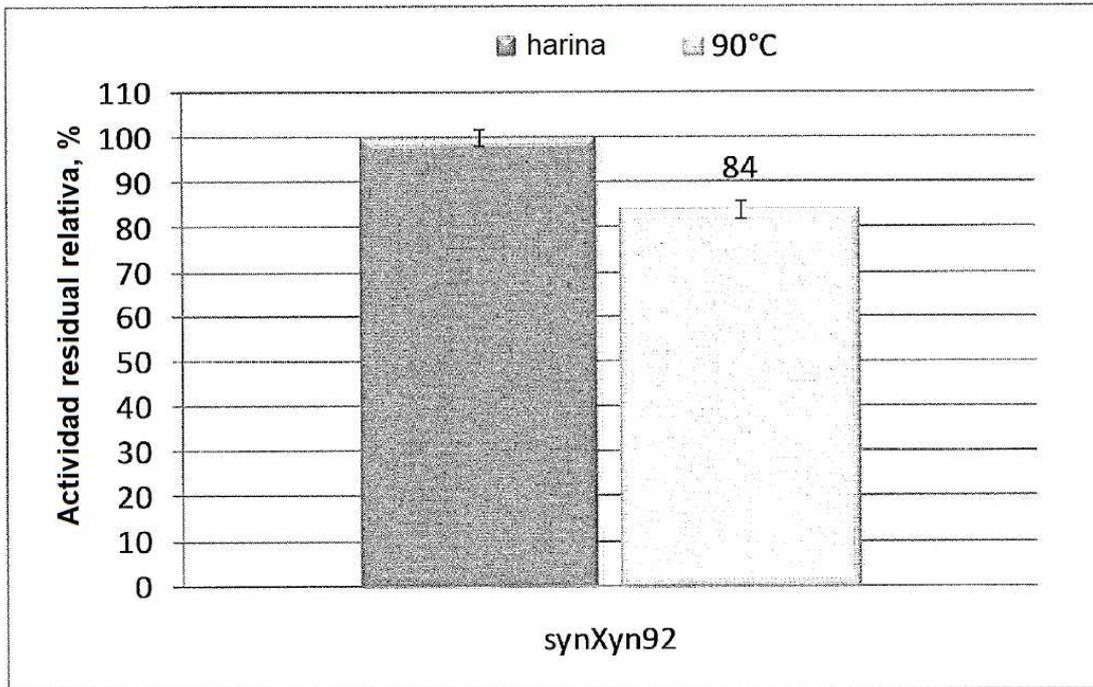


FIGURA 16

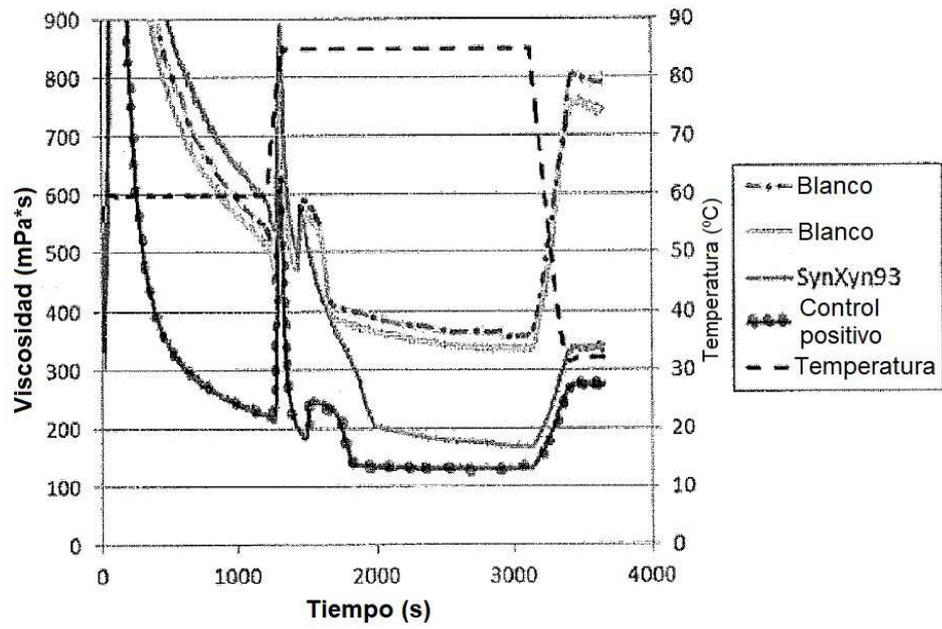


FIGURA 17

