

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 767**

51 Int. Cl.:

<b>A61P 1/14</b>	(2006.01)
<b>C12P 19/14</b>	(2006.01)
<b>C12N 9/24</b>	(2006.01)
<b>C12C 7/04</b>	(2006.01)
<b>C12C 5/00</b>	(2006.01)
<b>C12C 11/00</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/189</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/38</b>	(2006.01)
<b>A23K 10/30</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015 PCT/EP2015/051982**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15114112**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 15702249 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3099791**

54 Título: **Proteína**

30 Prioridad:

**31.01.2014 GB 201401648**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.03.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 811 767 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 que son termoestables y al uso de dichas xilanasas en aplicaciones, que incluyen aplicaciones en alimentos para animales, en la elaboración de cerveza o malta, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilano, como los materiales a base de grano, por ejemplo, en la producción de biocombustibles u otros productos de fermentación, que incluyen compuestos bioquímicos (por ejemplo, con base biológica de isopreno) y/o en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, y a los métodos de uso de estas xilanasas, además de composiciones (tales como composiciones de aditivo para pienso) que comprenden dichas xilanasas.

**Antecedentes de la invención**

15 Durante muchos años, las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8) (denominadas xilanasas en la presente memoria) se han utilizado para la modificación de carbohidratos complejos derivados del material de la pared celular de las plantas. Es muy conocido en la técnica que la funcionalidad de distintas xilanasas (derivadas de microorganismos o plantas diferentes) difiere enormemente. Xilanasas es el nombre dado a una clase de enzimas que degradan el polisacárido lineal beta-1,4-xilano a xilooligosacáridos o xilosa y descomponen, de esta manera, la hemicelulosa, uno de los componentes principales de las paredes celulares de las plantas.

En función de la información estructural y genética, las xilanasas se han clasificado en distintas familias de glicósido hidrolasa (GH) (Henrissat, (1991) *Biochem. J.* 280, 309-316).

20 Inicialmente, todas las xilanasas conocidas y caracterizadas pertenecían a las familias GH10 o GH11. Después, otros trabajos identificaron muchos otros tipos 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, ya que es la única familia que consiste solamente en xilanasas específicas de xilano. La estructura de las xilanasas GH11 puede describirse como una estructura de barril  $\beta$  tipo remolino o una estructura plegada en sándwich de todas las hebras  $\beta$  (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 intervalo de 32-39 kDa. La estructura del dominio catalítico de las xilanasas GH10 consiste en un barril  $\beta/\alpha$  de 8 pliegues (Harris *et al* 1996 – *Acta. Crystallog. Sec. D* 52, 393-401).

30 Las estructuras tridimensionales están disponibles para un gran número de enzimas de la Familia GH10, las primeras resueltas son aquellas de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (Derewenda *et al*, *J Biol Chem* 19 de agosto de 1994; 269(33) 20811-4), la endoglucanasa Cex de *C. fimi* (White *et al* *Biochemistry*, 25 de octubre de 1994; 33(42) 12546-52) y la Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (anteriormente, *Pseudomonas fluorescens* subesp. xilanasas A) (Harris *et al* *Structure* 15 de noviembre de 1994; 2(11) 1107-16). Como miembros del Clan GHA tienen un plegamiento de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> clásico con los dos ácidos glutámicos clave del sitio activo ubicados en los extremos C-terminal de las hebras beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat *et al*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 18 de julio de 1995; 92(15) 7090-4).

35 Se han realizado estudios integrales que caracterizan la funcionalidad de las xilanasas en sustratos puros y bien caracterizados (Kormelink *et al.*, 1992 *Characterisation and mode of action of xylanases and some accessory enzymes*. Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, Holanda (175 pág., resúmenes en inglés y alemán)). Estos estudios muestran que distintas xilanasas tienen diferentes requerimientos específicos con respecto a la sustitución del esqueleto de xilosa del arabinoxilano (AX). Algunas xilanasas requieren tres residuos de xilosa no sustituidos para hidrolizar el esqueleto de xilosa; otros requieren solo uno o dos. Se cree que las razones para estas diferencias en la especificidad se deben a la estructura tridimensional dentro de los dominios catalíticos que, a su vez, dependen de la estructura primaria de la xilanasas, es decir, la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la traducción de estas diferencias en las secuencias de aminoácidos a diferencias en la funcionalidad de las xilanasas hasta ahora no se ha documentado cuando la xilanasas actúa en un entorno complejo, tal como un material vegetal, por ejemplo, en un alimento para animales.

40 Los sustratos de xilanasas en material vegetal, por ejemplo, en el trigo, se han dividido, tradicionalmente, en dos fracciones: AX no extraíble en agua (WU-AX) y AX extraíble en agua (WE-AX). Se han proporcionado muchas explicaciones acerca de por qué hay 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 altas en el grado de sustitución entre WE-AX y WU-AX. El grado de sustitución más alto se encontró en WE-AX. Esto se utilizó para explicar por qué algunos AX eran extraíbles. El alto grado de sustitución hizo que el polímero fuera soluble en comparación con un grado de sustitución menor, que causaría la unión de hidrógeno entre polímeros y, en consecuencia, la precipitación.

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

Se ha informado sobre enzimas xilanasas para casi 100 organismos diferentes, incluidos plantas, hongos y bacterias. Las enzimas xilanasas se clasifican en varias de las más de 40 familias de enzimas glicosil hidrolasas. Las enzimas glicosil hidrolasas, que incluyen xilanasas, mananasas, amilasas,  $\beta$ -glucanasas, celulasas y otras carbohidrasas se clasifican en función de propiedades tales como la secuencia de aminoácidos, su estructura tridimensional y la geometría de su sitio catalítico (Gilkes, et al., 1991, Microbiol. Reviews 55: 303-315).

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra una secuencia de polipéptidos (SEQ ID No. 26) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). La porción subrayada (letras minúsculas) de la secuencia refleja un péptido señal N-terminal que puede escindirse antes de que la enzima esté madura. Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación posterior a la traducción antes de que la enzima esté completamente madura. En algunas realizaciones, esta secuencia puede ser la secuencia esqueleto.

La Figura 1B muestra una secuencia de polipéptidos (SEQ ID No. 27) de una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación posterior a la traducción antes de que la enzima esté completamente madura. En algunas realizaciones, esta secuencia puede ser la secuencia esqueleto.

La Figura 1C muestra una secuencia de polipéptidos (SEQ ID No. 1) de una xilanasas mencionada en la presente memoria como FveXyn4. Esta es la forma activa de la enzima. En la presente memoria puede hacerse referencia a ella como la forma madura de la enzima (en algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto).

La Figura 2A muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 24) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). Los nucleótidos en letras minúsculas que están en negrita muestran la secuencia de intrones. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 2B muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 25) que codifica una xilanasas de la presente invención (FveXyn4). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 2C muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 2) que codifica una xilanasas mencionada en la presente memoria como FveXyn4.

La Figura 3A muestra una secuencia de polipéptidos (SEQ ID No. 28) de una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). La porción subrayada (letras minúsculas) de la secuencia puede reflejar un péptido señal N-terminal que puede escindirse antes de que la enzima esté madura. Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación posterior a la traducción antes de que la enzima esté completamente madura. En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

La Figura 3B muestra una secuencia de polipéptidos (SEQ ID No. 29) de una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). Además, los aminoácidos mostrados en negrita y cursiva pueden escindirse a través de la modificación posterior a la traducción antes de que la enzima esté completamente madura. Esta secuencia puede ser una forma activa de la proteína y puede ser una sola forma activa de la proteína. En la presente memoria, puede hacerse referencia a ella como la forma madura de la enzima. En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

La Figura 3C muestra una secuencia de polipéptidos (SEQ ID No. 3) de una xilanasas mencionada en la presente memoria como FoxXyn2. Esta es otra forma activa de la enzima. En algunas realizaciones, en la presente memoria puede hacerse referencia a ella como la forma madura de la enzima. En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

La Figura 4A muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 30) que codifica una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). Los nucleótidos en letras minúsculas que están en negrita muestran la secuencia de intrones. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 4B muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 31) que codifica una xilanasas de la presente invención (FoxXyn2). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).

La Figura 4C muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 4) que codifica una xilanasas mencionada en la presente memoria como FoxXyn2.

La Figura 5 muestra una secuencia de polipéptidos (SEQ ID No. 5) de una xilanasas de Fusarium; Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). En algunas realizaciones, esta secuencia es una secuencia esqueleto.

- La Figura 6A muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 32) que codifica una xilanasa para su uso en la presente invención que proviene de *Fusarium*, obtenida del Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). Los nucleótidos en letras minúsculas que están en negrita muestran la secuencia de intrones. La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas).
- 5 Los cambios comparados con SEQ ID No. 24 aparecen subrayados.
- La Figura 6B muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 33) que codifica una xilanasa para su uso en la presente invención que proviene de *Fusarium*, obtenida del Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>). La secuencia que codifica la secuencia señal se muestra en negrita (mayúsculas). Los cambios comparados con SEQ ID No. 25 aparecen subrayados.
- 10 La Figura 6C muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 6) que codifica una xilanasa para su uso en la presente invención que proviene de *Fusarium*, obtenida del Fusarium Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>), los cambios con respecto a SEQ ID No. 4 están subrayados.
- La Figura 7 muestra un alineamiento de las proteínas maduras para FveXyn4 (SEQ ID No. 1), FoxXyn2 (SEQ ID No. 3) y la xilanasa que se muestra en la presente memoria como SEQ ID No. 5 (FVEG\_13343T0).
- 15 La Figura 8 muestra secuencias de nucleótidos (sin intrones) de las secuencias codificantes de las xilanasas GH10 variantes de acuerdo con la presente invención (SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10 y SEQ ID No. 11).
- La Figura 9 muestra secuencias de nucleótidos (los intrones se muestran subrayados) de las secuencias codificantes de xilanasas GH10 variantes de acuerdo con la presente invención (SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 y SEQ ID No. 16).
- 20 La Figura 10 muestra secuencias de aminoácidos de las xilanasas GH10 variantes maduras de acuerdo con la presente invención (SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 y SEQ ID No. 21).
- La Figura 11 muestra el valor de T<sub>m</sub> de las 5 variantes A, B, C, D y E en comparación con FveXyn4. El valor de T<sub>m</sub> se mide como la temperatura a la cual se obtiene 50% de actividad residual después de 10 min de incubación.
- 25 La Figura 12 muestra el perfil de pH de las cinco variantes medido a pH 4,0, 5,0 y 6,0 y todos los datos son relativos a FveXyn4 a pH 5,0.
- Las Figuras 13a y b muestran la solubilización de pentosana a partir de cDDGS (arriba, Figura 13a) y salvado de trigo (abajo, Figura 13b) como una función de la dosificación de la xilanasa.
- La Figura 14 muestra la reducción de viscosidad en el ensayo de reducción de viscosidad en un modelo animal *in vitro* que se ilustra en el Ejemplo 1 por las variantes de la presente invención y en comparación con FveXyn4 y la referencia Econase XT. La reducción de viscosidad se mide en trigo de alta viscosidad.
- 30 La Figura 15 muestra la recuperación de xilanasa después de la granulación en el pienso a 90 y 95 °C. La actividad se muestra en relación con la muestra de pasta. Las muestras que contienen FveXyn4 se analizaron con el uso del método de extracción, mientras que las muestras que contienen la variante A-E se analizaron con el uso del método de suspensión acuosa; ambos métodos se describen en la sección de materiales y métodos del Ejemplo 1.
- 35 La Figura 16 muestra un mapa plasmídico de pZZH254.
- La Figura 17 muestra el perfil de temperatura de FveXyn4.
- La Figura 18 muestra un mapa plasmídico de pZZH135.
- La Figura 19 muestra el perfil de temperatura de FoxXyn2.
- 40 La Figura 20 muestra el mapa esquemático de pEntry-FveXyn4.
- La Figura 21 muestra mapas esquemáticos del vector de destino pTTTpyr2 y vectores de expresión para las variantes de FveXyn4 (pTTTpyr2-FveXyn4) y FveXyn4s (pTTTpyr2-FveXyn4\_VAR).
- La Figura 22 muestra la reducción de viscosidad en el material a base de grano de una enzima esqueleto (parental) FveXyn4 en comparación con las variantes termoestables A, B, C, D y E de acuerdo con la presente invención. Fve Xyn4 y las variantes actúan en una forma similar, de manera que muestran una reducción de viscosidad de 55-67% en comparación con el blanco (solo SPEZYME® CL).
- 45

### Compendio de la invención

Una conclusión fundamental de la presente invención es la modificación de una xilanasa GH10 para hacer que la xilanasa GH10 sea más termoestable.

Por primera vez, los autores de la presente invención han identificado residuos clave para la modificación con el fin de hacer que las xilanasas GH10 sean termoestables.

Además, por primera vez, los autores de la presente invención han identificado sustituciones/modificaciones clave con el fin de hacer que las xilanasas GH10 sean termoestables.

- 5 Particularmente, la invención se refiere a la identificación de residuos específicos y modificaciones específicas de una xilanasas, por ejemplo, una xilanasas GH10, para hacer que sea más termoestable, y al mismo tiempo, asegurar que las otras propiedades de la xilanasas se mantengan sin modificación.

Una de las otras propiedades de la xilanasas de la presente invención es su capacidad para descomponer (solubilizar) arabinoxilanos insolubles (AXinsol).

- 10 Particularmente, las variantes de xilanasas de la presente invención descomponen (solubilizan) eficazmente el AXinsol a partir de una gran variedad de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., particularmente, maíz y sustratos a base de maíz, particularmente, productos de trigo (que incluyen aquellos a base de trigo) y de maíz (que incluyen aquellos a base de maíz). Esto contrasta con las enzimas conocidas anteriormente, que son, frecuentemente, inferiores con respecto a la solubilización del AXinsol en sustratos de maíz o a base de maíz o que no son eficaces en sustratos a base de trigo y maíz.

- Además, las variantes de xilanasas de la presente invención son particularmente adecuadas para descomponer (solubilizar) el AXinsol y, además, para descomponer (o degradar) los polímeros solubilizados eficazmente. La capacidad para descomponer (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos a partir de la disolución del AXinsol) permite obtener una reducción de viscosidad (rápida) o los polímeros solubilizados (obtenidos a partir de la disolución del AXinsol) pueden no contribuir al aumento de la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

- 20 Sin intención de restringirse por la teoría, la variante de la enzima de la presente invención libera principalmente polímeros, que no contribuyen a la viscosidad, debido a que los polímeros liberados son cortos.

- 25 Típicamente, las xilanasas convencionales pueden descomponer AXinsol, pero, frecuentemente, conducirán a un aumento en la viscosidad de la mezcla. Esta mayor viscosidad es una desventaja en muchas aplicaciones.

Sin intención de restringirse por la teoría, aunque algunas xilanasas convencionales descomponen AXinsol, estas conducen a un aumento en productos de degradación solubles de peso molecular alto, lo que conduce a un aumento en la viscosidad en la mezcla.

- 30 Además, o de manera alternativa, y nuevamente sin intención de restringirse por la teoría, las enzimas xilanasas convencionales pueden descomponer el AXinsol, pero, dado que no degradan los productos solubilizados de peso molecular alto con la rapidez suficiente, la viscosidad en la mezcla no es ideal. En contraste, con los métodos y usos de la presente invención, las variantes de xilanasas descomponen el AXinsol sin aumentar la viscosidad y/o mientras reducen la viscosidad rápidamente en comparación con las enzimas convencionales. Sin intención de estar limitados por la teoría, se cree que los productos de peso molecular alto no se forman por las enzimas de la presente invención.

- 35 Se ha descubierto que las enzimas de la presente invención y descritas en la presente memoria no solo descomponen (solubilizan) los arabinoxilanos insolubles (AXinsol) a partir de una amplia variedad de sustratos que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., particularmente, sustratos de maíz y a base de maíz, particularmente, productos de trigo (que incluyen aquellos a base de trigo) y de maíz (que incluyen aquellos a base de maíz), sino, además, aseguran eficazmente que la viscosidad no aumente y/o se reduzca. Sin intención de estar limitados por la teoría, se cree que los productos de peso molecular alto no se forman por las enzimas de la presente invención.

- 40 Por lo tanto, la presente invención se refiere a las enzimas capaces de solubilizar pentosanas, particularmente, materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, particularmente, arabinoxilanos insolubles. Particularmente, la enzima es particularmente apta para solubilizar pentosanas, particularmente, materiales que contienen xilano, tales como arabinoxilanos, particularmente, arabinoxilanos insolubles, en un amplio espectro de sustratos, que incluyen los sustratos a base de maíz.

- 45 La presente invención se refiere, adicionalmente, a las enzimas capaces de degradar AXsol o a los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o reduzca en la mezcla de reacción.

- Muchas de las xilanasas comercializadas para su uso en alimentos para animales con el fin de solubilizar pentosanas son enzimas GH11. Los experimentados en la técnica consideraban que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes en la solubilización de las pentosanas, particularmente, AXinsol, en comparación con las xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha descubierto que la xilanasas novedosa descrita en la presente memoria, que es una xilanasas GH10, es particularmente apta para degradar el AXinsol en un amplio espectro de sustratos, que incluyen los sustratos a base de maíz. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han comprobado que las variantes de xilanasas GH10 de la presente invención tienen mejor rendimiento que las xilanasas GH11 en cuanto a su capacidad para solubilizar pentosanas. Además, las variantes de xilanasas GH10 son termoestables.

5 El hecho de que las presentes enzimas degradan eficazmente el AXinsol a partir de sustratos de maíz y a base de maíz es significativamente ventajoso, ya que el maíz contiene mucho más AX en la forma insoluble en comparación con otros cereales, tal como, por ejemplo, trigo y centeno. Por lo tanto, solo las xilanasas que pueden descomponer el AXinsol pueden mostrar un beneficio significativo para los animales alimentados con la dieta basada en maíz, tal como, por ejemplo, la dieta basada en maíz y soja.

Era completamente inesperado que una xilanasas GH10 fuera tan apta para degradar AXinsol en cereales, particularmente, en sustratos de maíz o a base de maíz.

10 Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar eficazmente (y rápidamente) los polímeros y oligómeros que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes en el material a base de grano. Esto conduce a una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 que se ilustran en la presente memoria, ya que son particularmente adecuadas en un número de aplicaciones para mantener la viscosidad en un nivel bajo o para reducir la viscosidad, por ejemplo, en alimentos para animales; en la elaboración de cerveza y/o malta; en la producción de glucosa basada en granos, por ejemplo, para el procesamiento adicional para biocombustibles y/o compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica); o en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, por ejemplo, para la producción de almidón.

15 Sorprendentemente, se ha descubierto que el producto de degradación en promedio es más corto para las enzimas GH10 probadas en la presente memoria en comparación con las enzimas GH11. Esto significa que los productos de degradación no contribuyen ni causan un aumento de la viscosidad.

20 En función de estos hallazgos, las variantes de xilanasas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para degradar un material que contiene xilano, particularmente, arabinoxilanos, particularmente, AXinsol. Adicional o alternativamente, las xilanasas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para degradar polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes (naturalmente) en materiales a base de grano. Sorprendentemente, se ha descubierto que las variantes de xilanasas de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar para degradar un material que contiene xilano, particularmente, arabinoxilanos, particularmente, AXinsol, y para degradar polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol.

25 Tales enzimas pueden aplicarse en muchas industrias, que incluyen alimentos para animales, elaboración de cerveza y malta, en el tratamiento de materias primas que contienen arabinoxilanos como materiales a base de grano; en la presente memoria, materiales a base de grano incluyen granos y cereales; en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, en la producción de jarabes derivados de almidón, en la producción de biocombustibles.

30 El término "variante o variantes de xilanasas", como se emplea en la presente memoria, se puede utilizar indistintamente con el término "xilanasas modificadas o xilanasas modificadas".

### Declaraciones de la invención

35 En un aspecto, la presente invención es una enzima, en donde dicha enzima es una xilanasas GH10 o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasas, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en dos o más de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F, o en donde la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 (mostrada en SEQ ID No. 1), en donde dicho fragmento tiene al menos 60% de la longitud de la enzima xilanasas GH10 de la cual deriva el fragmento, y en donde dicha enzima es:

40 a) una enzima xilanasas que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad, con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o

45 b) una enzima xilanasas codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad, con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

En otro aspecto, la presente invención es una molécula de ácido nucleico recombinante preferiblemente que codifica la enzima de la presente invención.

50 En otro aspecto más, la presente invención es un vector que comprende el ácido nucleico recombinante de la presente invención.

En un aspecto adicional la presente invención es una construcción recombinante que comprende el ácido nucleico recombinante de la presente invención.

En otro aspecto adicional, la presente invención es una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico de la presente invención.

5 En otro aspecto, la presente invención es un método para mejorar la termoestabilidad de una xilanasa GH10, que comprende: modificar una xilanasa GH10 parental para que comprenda los siguientes aminoácidos en dos o más de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente 79Y, F o V, más preferiblemente Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente 217Q, E o P, más preferiblemente Q); y 298Y, F o W (preferiblemente Y o F, más preferiblemente Y), en donde la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1.

En otro aspecto más, la presente invención es una composición de enzima o una composición de aditivo para pienso que comprenden la enzima de la presente invención.

10 En un aspecto adicional la presente invención es una premezcla que comprende una enzima xilanasa GH10 de la presente invención, o la composición de enzima o la composición de aditivo para pienso de la presente invención, en al menos una vitamina y/o al menos un mineral.

En otro aspecto adicional, la presente invención es un pienso (o alimento para animales) que comprende dicha enzima de la presente invención, o la composición de enzima o la composición de aditivo para pienso de la presente invención.

15 En otro aspecto, la presente invención consiste en el uso de dicha enzima de la presente invención, o la composición de enzima o la composición de aditivo para pienso de la presente invención para degradar arabinoxilano en un material que contiene xilano.

20 En la presente memoria se describe una enzima xilanasa GH10 modificada o un fragmento de la misma que tiene actividad xilanasa, en donde dicha xilanasa GH10 modificada o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasa GH10 parental, habiendo sido modificada la xilanasa GH10 parental en dos o más de (preferiblemente en tres o más, más preferiblemente al menos cinco de) las siguientes posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, en donde la numeración se basa en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

25 También se describe en la presente memoria una molécula de ácido nucleico (por ejemplo una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante) que codifica una xilanasa termoestable y que comprende (o consiste en) una secuencia de polinucleótidos esqueleto que comprende (o consiste en) una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

a. una secuencia de nucleótidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o

30 b. una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99% de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o

c. una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse a SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta;

35 cuya secuencia de polinucleótidos esqueleto está modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en al menos los cinco) codones que codifican los aminoácidos 7, 33, 79, 217 y 298 en el polipéptido codificado, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

40 Adicionalmente se describe en la presente memoria un vector (por ejemplo un plásmido) o construcción que comprende (o consiste en) una secuencia de polinucleótidos esqueleto que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

a. una secuencia de nucleótidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o

45 b. una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99% de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o

c. una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse a SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta;

50 cuya secuencia de polinucleótidos esqueleto está modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en al menos los cinco) codones que codifican los aminoácidos 7, 33, 79, 217 y 298 en el polipéptido codificado, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

La presente invención también proporciona adicionalmente una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector o construcción de acuerdo con la presente invención.

En la presente memoria se describe un método para mejorar la termoestabilidad de una xilanasa GH10, que comprende: modificar una xilanasa GH10 parental en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en las cinco) posiciones siguientes: 7, 33, 79, 217 y 298, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

- 5 En otro aspecto, la presente invención proporciona una enzima que tiene actividad xilanasa; siendo dicha enzima una xilanasa GH10 o un fragmento de la misma; teniendo dicha enzima modificaciones en dos o más de (convenientemente, tres o más, convenientemente, al menos todas) las posiciones siguientes 7, 33, 79, 217 y 298, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1), y teniendo dicha enzima una mayor termoestabilidad en comparación con una xilanasa GH10 que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica a dicha enzima, excepto por dichas modificaciones.

10 En la presente memoria se describe adicionalmente una enzima xilanasa GH10 o un fragmento de la misma, que tiene actividad xilanasa, en donde dicha enzima xilanasa GH10 comprende un polipéptido que tiene al menos 70% (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99%) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más de (convenientemente, en tres o más, convenientemente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente, 79Y, F o V, más preferiblemente, Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente, 217Q, E o P, más preferiblemente, Q); y 298Y, F o W (preferiblemente, Y o F, más preferiblemente, Y), en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

20 En la presente memoria se describe también adicionalmente una enzima xilanasa GH10 o un fragmento de la misma, que tiene actividad xilanasa, en donde dicha enzima xilanasa GH10 comprende un polipéptido que tiene al menos 90% (convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99%) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental o esqueleto); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más de (convenientemente, en tres o más, convenientemente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y; 217Q); y 298Y, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

También se describe en la presente memoria un método para producir una variante de xilanasa, que comprende:

a. modificar (por ejemplo, transformar) una célula anfitriona con una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente memoria, o un vector o construcción (por ejemplo; construcción de ADN) como se describe en la presente memoria, o con una construcción de ADN que comprende un promotor que tiene actividad de transcripción en la célula anfitriona conectada operablemente con una secuencia de polinucleótido heteróloga como se describe en la presente memoria, o con una construcción de ADN que comprende un promotor que tiene actividad de transcripción en la célula anfitriona conectada operablemente con una secuencia de polinucleótidos heteróloga como se describe en la presente memoria, o con una construcción de ADN que comprende un promotor que tiene actividad de transcripción de la célula anfitriona conectada operablemente con una secuencia de polinucleótidos heteróloga que codifica una variante de xilanasa como se describe en la presente memoria;

b. cultivar la célula anfitriona modificada (por ejemplo, transformada) en un medio de cultivo adecuado para permitir la expresión de la xilanasa.

40 En la presente memoria se describe adicionalmente un producto fermentado producido por el método descrito en la presente memoria.

Aun otro aspecto de la presente invención es la provisión de una xilanasa producida por el método descrito en la presente memoria.

45 En la presente memoria se describe una composición enzimática que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria, b) el producto fermentado como se describe en la presente memoria o c) una combinación de los mismos.

50 En la presente memoria se describe adicionalmente una composición de aditivo para pienso que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria, b) el producto fermentado como se describe en la presente memoria, o c) una combinación de los mismos.

55 En la presente memoria se describe adicionalmente una premezcla que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria, b) el producto fermentado como se describe en la presente memoria, c) la composición enzimática como se describe en la presente memoria, d) una composición de aditivo para pienso como se describe en la presente memoria, o e) una combinación de los mismos; y al menos una vitamina y/o al menos un mineral.

En la presente memoria también se describe adicionalmente un pienso (o alimento para animales) que comprende a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de acuerdo con la presente invención, b) el producto fermentado como se describe en la presente memoria, c) la composición enzimática como se describe en la presente memoria, d) una composición de aditivo para pienso como se describe en la presente memoria, e) una premezcla como se describe en la presente memoria o f) una combinación de los mismos.

En la presente memoria se describe un método para preparar un alimento para animales, que comprende mezclar un componente para pienso con a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria, b) el producto fermentado como se describe en la presente memoria, c) la composición enzimática como se describe en la presente memoria, d) una composición de aditivo para pienso como se describe en la presente memoria, e) una premezcla como se describe en la presente memoria o f) una combinación de los mismos.

En la presente memoria también se describe adicionalmente un método para degradar material que contiene arabinoxilano en un material que contiene xilano, que comprende mezclar dicho material que contiene xilano con a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, como se describe en la presente memoria, b) el producto fermentado como se describe en la presente memoria, c) la composición enzimática como se describe en la presente memoria, d) una composición de aditivo para pienso como se describe en la presente memoria, e) una premezcla como se describe en la presente memoria o f) una combinación de los mismos.

En la presente memoria se describe el uso de a) una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma como se describe en la presente memoria, b) el producto fermentado de acuerdo con la presente invención, c) la composición enzimática como se describe en la presente memoria, d) una composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención, e) una premezcla de acuerdo con la presente invención o f) una combinación de los mismos para solubilizar arabinoxilano en un material que contiene xilano.

#### **Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención**

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente entendido por el experto normal en la técnica a la cual pertenece esta descripción. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20ª ED., John Wiley and Sons, New York (1994) y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experto en la técnica un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta descripción.

Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de cualquier otra manera, cualquier secuencia de ácido nucleico se escribe de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi, respectivamente.

En la presente memoria se hace referencia a los aminoácidos por medio del nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una sola letra.

El término "proteína", como se emplea en la presente memoria, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

Como se emplea 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".

Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en la presente memoria. En la presente descripción y en las reivindicaciones, se pueden utilizar los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los residuos de aminoácidos. El código de 3 letras para los aminoácidos es el que se define de acuerdo con IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Se entiende, además, que un polipéptido puede estar codificado por más de una secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

Pueden encontrarse otras definiciones de términos en toda la memoria descriptiva. Además, se entiende que la terminología utilizada en la presente memoria está prevista para describir realizaciones particulares solamente, y no como una limitación, ya que el alcance de la presente descripción limitado solamente por las reivindicaciones anexas.

Se entiende que cuando se proporciona un intervalo de valores, cada valor intermedio hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo también se describe específicamente. Cada intervalo menor entre cualquier valor mencionado o valor intermedio en un intervalo mencionado y cualquier otro valor mencionado o intermedio en ese intervalo mencionado queda abarcado dentro de esta descripción. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el cual alguno, ninguno o ambos límites se incluyen en los intervalos menores está comprendido, además, dentro de esta descripción, sujeto a cualquier límite

específicamente excluido en el intervalo mencionado. Cuando el intervalo mencionado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o los dos límites incluidos están comprendidos, además, en esta descripción.

Debe mencionarse que, tal como se emplea en la presente memoria y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “uno/una” y “el/la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una enzima” incluye una pluralidad de esos agentes candidato y la referencia a “el pienso” incluye la referencia a uno o más piensos y equivalentes de estos conocidos para un experto en la técnica, y así sucesivamente.

Las publicaciones descritas en la presente memoria se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo descrito en la presente memoria se interpretará como una admisión de que dichas publicaciones constituyen una materia anterior a las reivindicaciones anexas a la presente invención.

Los precios cada vez mayores de la materia prima utilizada tradicionalmente como fuente de energía en piensos para animales, como materia prima en la producción de biocombustibles, como un ingrediente en la elaboración de cerveza o malta o como materia prima en procedimientos de separación del almidón del gluten de trigo, por ejemplo, han conducido a la inclusión de materiales fibrosos de bajo coste en los sustratos iniciales para estas industrias, particularmente, el uso de subproductos fibrosos de bajo coste en piensos para animales.

La adición de fibras puede producir varios efectos desfavorables. Por ejemplo, en los piensos para animales, la adición de fibras puede causar efectos antinutricionales. La presencia de polímeros no degradados en el intestino de los animales genera un contenido altamente viscoso y dificulta la difusión lo que da como resultado una absorción reducida de nutrientes. Además, los polímeros tienen una capacidad de retención de agua alta lo que dificulta la reabsorción eficaz de agua y la retención de agua aumenta el volumen del contenido del intestino, lo que conduce a un menor tiempo de tránsito intestinal (Englyst & Kingman (1993) en Human Nutrition and Dietetics, 9.<sup>a</sup> edición (Garrow J. S., James W. P. T., eds.) pág. 53).

En alimentos para animales, la hemicelulosa y la celulosa (que incluyen arabinosilano insoluble) forman, además, barreras físicas que encapsulan (o atrapan) nutrientes como almidón y proteína y, de esta manera, retienen el acceso a estos nutrientes para el animal.

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

La liberación de nutrientes y agua de los alimentos para animales como consecuencia de la degradación de la barrera física depende de la capacidad de la xilanasas para degradar componentes de fibra insoluble (por ejemplo, arabinosilanos insolubles (AXinsol)).

En la presente memoria se describe una enzima, en donde dicha enzima es una xilanasas GH10 o un fragmento de la misma, que tiene actividad xilanasas, en donde dicha enzima o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasas GH10 parental; la xilanasas GH10 parental se modificó en al menos dos de las posiciones siguientes 7, 33, 79, 217 y 298, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

En la presente memoria se describe una enzima, en donde dicha enzima es una xilanasas GH10 o un fragmento de la misma, que tiene actividad xilanasas, en donde dicha enzima o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasas GH10 parental; la xilanasas GH10 parental se modificó en al menos tres de las posiciones siguientes 7, 33, 79, 217 y 298, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

En la presente memoria se describe una enzima, en donde dicha enzima es una xilanasas GH10 o un fragmento de la misma, que tiene actividad xilanasas, en donde dicha enzima o fragmento de la misma tiene una mayor termoestabilidad en comparación con una enzima xilanasas GH10 parental; la xilanasas GH10 parental se modificó en al menos las posiciones siguientes 7, 33, 79, 217 y 298, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos (preferiblemente, al menos tres) de las modificaciones siguientes:

N7D;

T33V;

K79Y, V, F, I, L o M;

A217Q, E, P, D o M; y

T298Y, F o W.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención comprende los aminoácidos siguientes en al menos dos (preferiblemente, al menos tres) de las posiciones indicadas:

5 7D;  
33V;  
79Y, V, F, I, L o M;  
217Q, E, P, D o M; y  
298Y, F o W.

10 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos (preferiblemente, al menos tres) de las modificaciones siguientes:

15 N7D;  
T33V;  
K79Y, F o V;  
A217Q, E o P; y  
T298Y o F.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención comprende los aminoácidos siguientes en al menos dos (preferiblemente, al menos tres) de las posiciones indicadas:

20 7D;  
33V;  
79Y, F o V;  
217Q, E o P; y  
298Y o F.

25 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención comprende al menos dos (preferiblemente, al menos tres) de las modificaciones siguientes:

30 N7D;  
T33V;  
K79Y;  
A217Q; y  
T298Y.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención comprende los aminoácidos siguientes en al menos dos (preferiblemente, al menos tres) de las posiciones indicadas:

35 7D;  
33V;  
79Y;  
217Q; y  
298Y.

40 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención comprende al menos las modificaciones siguientes:

45 N7D;  
T33V;  
K79Y, V, F, I, L o M;  
A217Q, E, P, D o M; y  
T298Y, F o W.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

50 7D;  
33V;  
79Y, V, F, I, L o M;  
217Q, E, P, D o M; y  
298Y, F o W.

En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención comprende al menos las modificaciones siguientes:

- 5 N7D;  
T33V;  
K79Y, F o V;  
A217Q, E o P; y  
T298Y o F.

10 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

- 15 7D;  
33V;  
79Y, F o V;  
217Q, E o P; y  
298Y o F.

En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención comprende al menos las modificaciones siguientes:

- 20 N7D;  
T33V;  
K79Y;  
A217Q; y  
T298Y.

25 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:

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

En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención puede estar modificada, adicionalmente, en una o más de las posiciones siguientes: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

35 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención puede estar modificada, adicionalmente, en dos o más de las posiciones siguientes: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

40 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención puede estar modificada, adicionalmente, en tres o más de las posiciones siguientes: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

45 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención puede estar modificada, adicionalmente, en cuatro o más de las posiciones siguientes: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

50 En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención puede estar modificada, adicionalmente, en cinco o más de las posiciones siguientes: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención puede estar modificada además, en siete o más de las posiciones siguientes: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

En una realización, además de estar modificada en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención puede estar modificada, adicionalmente, en nueve o más de las posiciones siguientes: 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219.

- 5 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 25, la modificación puede ser N25P. En otras palabras, el aminoácido en el residuo 25 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, P.

- 10 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 57, la modificación se puede seleccionar entre S57Q, T o V (preferiblemente, Q). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 57 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, Q, T o V (preferiblemente, Q).

Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 62, la modificación se puede seleccionar entre N62T o S (preferiblemente, T). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 62 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, T o S (preferiblemente, T).

- 15 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 64, la modificación se puede seleccionar entre G64T o S (preferiblemente, T). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 64 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, T o S (preferiblemente, T).

- 20 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 89, la modificación se puede seleccionar entre S89G, N, Q, L o M (preferiblemente, G o Q, más preferiblemente, G). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 89 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, G, N, Q, L o M (preferiblemente, G o Q, más preferiblemente, G).

Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 103, la modificación se puede seleccionar entre T103M o K (preferiblemente, M). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 103 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, M o K (preferiblemente, M).

- 25 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 115, la modificación se puede seleccionar entre V115E o L (preferiblemente, L). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 115 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, E o L (preferiblemente, L).

Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 147, la modificación puede ser N147Q. En otras palabras, el aminoácido en el residuo 147 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, Q.

- 30 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 181, la modificación se puede seleccionar entre G181Q, A, D o P (preferiblemente, Q). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 181 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, Q, A, D o P (preferiblemente, Q).

- 35 Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 193, la modificación se puede seleccionar entre S193Y o N (preferiblemente, Y). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 193 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, 193Y o N (preferiblemente, Y).

Cuando la enzima xilanasa modificada está modificada, adicionalmente, en la posición 219, la modificación se puede seleccionar entre G219D o P (preferiblemente, P). En otras palabras, el aminoácido en el residuo 219 de la xilanasa GH10 de la presente invención es, preferiblemente, D o P (preferiblemente, P).

- 40 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 comprende, adicionalmente, modificaciones en los residuos siguientes: 25 y 89 (preferiblemente, N25P y S89G).

- 45 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 comprende, adicionalmente, modificaciones en los residuos siguientes: 57, 62, 64 y 89 (preferiblemente, S57Q, N62T, G64T y S89G).

- 50 En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 comprende, adicionalmente, modificaciones en los residuos siguientes: 25, 57, 62, 64, 103, 115, 147, 181, 193 y 219 (preferiblemente, N25P, S57Q, N62T, G64T, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y y G219P).

En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 comprende, adicionalmente, modificaciones en los residuos siguientes: 25, 57, 62, 89, 103, 115, 147, 181, 193 y 219 (preferiblemente, N25P, S57Q, N62T, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, G219P y T298Y).

En una realización, la enzima xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención, además de comprender modificaciones en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en todas) las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 comprende, adicionalmente, modificaciones en los residuos siguientes: 25, 89 y 64 (preferiblemente, N25P, S89G, G64T).

5 En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) de acuerdo con la presente invención puede comprender los aminoácidos siguientes en las posiciones indicadas:

- a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
- b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
- 10 c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
- d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
- e., 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
- f. 79F\_217Q\_y 298F;
- g. 7D,\_33V,\_217Q\_y 298F;
- h. 7D,\_79F y 298F;
- 15 i. 33V, 79F\_y\_217Q;
- j. 7D, 33V\_y\_298Y;
- k. 33V,\_217Q\_y 298Y;
- l. 7D,\_ 217Q y\_298F;
- m. 7D,\_33V y 217Q;
- 20 n. 79F y 298F;
- o. 7D y 79F;
- p. 33V\_y 79F;
- q. 33V\_y\_298Y;
- r. 7D\_y 33V; o
- 25 s. 33V\_y\_ A217Q.

En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) de acuerdo con la presente invención puede comprender los aminoácidos siguientes en las posiciones indicadas:

- a. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
- b. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
- 30 c. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
- d. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
- e. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;

En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) de acuerdo con la presente invención puede comprender las modificaciones siguientes:

- a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;
- b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;
- 35 c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;
- d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;
- e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;
- 40 f. K79F\_A217Q\_T298F;
- g. N7D\_T33V\_A217Q\_T298F;
- h. N7D\_K79F\_T298F;
- i. T33V\_K79F\_A217Q;
- j. N7D\_T33V\_T298Y;
- 45 k. T33V\_A217Q\_T298Y;
- l. N7D\_A217Q\_T298F;
- m. N7D\_T33V\_A217Q;
- n. K79F\_T298F;
- o. N7D\_K79F;
- 50 p. T33V\_K79F;
- q. T33V\_T298Y;
- r. N7D\_T33V; o
- s. T33V\_ A217Q.

55 En una realización, la enzima xilanasa modificada (o la xilanasa GH10) de acuerdo con la presente invención puede comprender las modificaciones siguientes:

- a. N7D, N25P, T33V, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;
- b. N7D, N25P, T33V, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;
- c. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;
- d. N7D, N25P, T33V, S57Q, N62T, K79Y, S89G, T103M, V115L, N147Q, G181Q, S193Y, A217Q, G219P y T298Y;

e. N7D, T33V, S57Q, N62T, G64T, K79Y, S89G, A217Q y T298Y;

En una realización, la enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, la enzima xilanasa modificada) tiene una secuencia de aminoácidos esqueleto (antes de la modificación) que comprende (o consiste en) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99% de identidad) con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99% de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24 o SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse a SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta.

El término "parental" significa una xilanasa, preferiblemente, una xilanasa GH10, en la que se le ha realizado una alteración para producir una enzima modificada de la presente invención. En una realización, la enzima parental es una xilanasa GH10. De manera conveniente, la enzima parental puede ser un polipéptido de origen natural (tipo salvaje) o una variante o fragmento del mismo. En una realización preferida, la enzima parental es un polipéptido de origen natural (polipéptido de tipo salvaje).

Convenientemente, la xilanasa modificada o la xilanasa GH10 de acuerdo con la presente invención comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a dicha enzima parental, excepto por una modificación en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en al menos las cinco) las posiciones siguientes 7, 33, 79, 217 y 298, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

En algunas realizaciones, la xilanasa modificada o la xilanasa GH10 de acuerdo con la presente invención comprende (o consiste esencialmente en o consiste en) una secuencia de aminoácidos que es idéntica o sustancialmente idéntica a la enzima parental, excepto por una modificación en dos o más de (preferiblemente, en tres o más, más preferiblemente, en al menos las cinco) posiciones siguientes: 7, 33, 79, 217 y 298, así como en una o más de las posiciones siguientes 25, 57, 62, 64, 89, 103, 115, 147, 181, 193, 219, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

La xilanasa GH10 modificada o la xilanasa GH10 de acuerdo con la presente invención (y reivindicada, por ejemplo, en la reivindicación 1) tiene, convenientemente, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia (preferiblemente, al menos 93%, convenientemente, al menos 97%, convenientemente, al menos 99% de identidad de secuencia con la enzima parental).

El término "esqueleto", como se emplea en la presente memoria, significa una secuencia de polipéptidos que es un polipéptido de xilanasa GH10, que está modificado para comprender los siguientes aminoácidos en dos o más de (preferiblemente, en tres o más de, más preferiblemente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente, 79Y, F o V, más preferiblemente, Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente, 217Q, E o P, más preferiblemente, Q); y 298Y, F o W (preferiblemente, Y o F, más preferiblemente, Y), en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 de la presente invención (por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 modificada) comprende, preferiblemente, un polipéptido que tiene al menos 70% (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99%) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental o esqueleto); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más de (preferiblemente, en tres o más de, más preferiblemente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente, 79Y, F o V, más preferiblemente, Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente, 217Q, E o P, más preferiblemente, Q); y 298Y, F o W (preferiblemente, Y o F, más preferiblemente, Y), en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1). La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 de la presente invención (por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 modificada) comprende, preferiblemente, un polipéptido que tiene al menos 95% (convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99%) de identidad con una xilanasa GH10 (por ejemplo, una xilanasa GH10 parental o esqueleto); y comprende los siguientes aminoácidos en dos o más de (preferiblemente, en tres o más de, más preferiblemente, en todas) las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y; 217Q; y 298Y, en donde la numeración está basada en la numeración de aminoácidos de FveXyn4 (SEQ ID No. 1).

En una realización, la xilanasa GH10 esqueleto o parental (antes de la modificación) es:

a. una xilanasa que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o

5 b. una enzima xilanasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99% de identidad) con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o

10 c. una enzima xilanasa codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o

15 d. una enzima xilanasa codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad (convenientemente, al menos 80%, convenientemente, al menos 90%, convenientemente, al menos 95%, al menos convenientemente, al menos 98%, convenientemente, al menos 99% de identidad) con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33; o

e. una enzima xilanasa codificada por una secuencia de nucleótidos que puede hibridarse a SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33 en condiciones de rigurosidad alta.

20 En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

25 En una realización, la secuencia de aminoácidos parental o esqueleto tiene al menos 98% de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, o SEQ ID No. 5.

En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

30 En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

35 En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

En una realización, la enzima xilanasa parental o esqueleto puede estar codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 98% de identidad con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

40 Convenientemente, la xilanasa GH10 parental o esqueleto puede obtenerse (ser convenientemente obtenida) de un organismo *Fusarium*.

Convenientemente, la xilanasa parental o esqueleto es una endo-1,4-β-d-xilanasa.

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

45 En una realización preferida, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención tiene un valor de T<sub>m</sub> mayor que 70°C (preferiblemente, mayor que 75°C), en donde el valor de T<sub>m</sub> se mide como la temperatura a la que se obtiene 50% de actividad residual después de 10 min de incubación.

La termoestabilidad de una xilanasa (por ejemplo, una xilanasa modificada) de acuerdo con la presente invención puede determinarse mediante el uso del "ensayo para la medición de la termoestabilidad" (véase a continuación).

50

## Ensayo para la medición de la termoestabilidad

Los perfiles de desnaturalización térmica de las variantes de FveXyn4 se determinaron por la dilución y preincubación de las muestras de enzimas en tampón MES 25 mM, pH 6,0, durante 10 min a temperaturas variables (66, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76, 76,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6 y 85°C, respectivamente) y, posteriormente, la medición de la actividad residual con el método de determinación de la actividad xilanasa descrito en el Ejemplo 1. La actividad medida sin preincubación se fijó en 100%, y la actividad residual de cada variante a cada una de las temperaturas se calculó en relación con esta. El valor de T<sub>m</sub> se calculó a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la que se obtiene 50% de la actividad residual.

En una realización, se considera que la enzima es termoestable de acuerdo con la presente invención cuando tiene un valor de T<sub>m</sub> mayor que 70°C, en donde el valor de T<sub>m</sub> es la temperatura a la que se obtiene 50% de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de T<sub>m</sub> puede determinarse de acuerdo con el ensayo para la medición de la termoestabilidad tal como se ilustra en la presente memoria.

En una realización, se considera que la enzima es termoestable de acuerdo con la presente invención cuando tiene un valor de T<sub>m</sub> mayor que 76°C, en donde el valor de T<sub>m</sub> es la temperatura a la que se obtiene 50% de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de T<sub>m</sub> puede determinarse de acuerdo con el ensayo para la medición de la termoestabilidad tal como se ilustra en la presente memoria.

En una realización, se considera que la enzima es termoestable de acuerdo con la presente invención cuando tiene un valor de T<sub>m</sub> mayor que 85°C, en donde el valor de T<sub>m</sub> es la temperatura a la que se obtiene 50% de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de T<sub>m</sub> puede determinarse de acuerdo con el ensayo para la medición de la termoestabilidad tal como se ilustra en la presente memoria.

Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención (o composición que la comprende) puede soportar un tratamiento térmico (por ejemplo, durante el procedimiento de peletización) de hasta aproximadamente 70°C; por ejemplo, hasta 75°C, por ejemplo, hasta 76°C, por ejemplo, hasta aproximadamente 85°C; por ejemplo, o hasta aproximadamente 95°C. El tratamiento térmico puede realizarse por un tiempo de hasta aproximadamente 1 minuto; hasta aproximadamente 5 minutos; hasta aproximadamente 10 minutos; hasta aproximadamente 30 minutos; hasta aproximadamente 60 minutos. Soportar un tratamiento térmico de este tipo significa que al menos aproximadamente 50% de la enzima que estaba presente/activa en el aditivo antes del calentamiento hasta la temperatura especificada todavía está presente/activa después de que se enfría hasta la temperatura ambiente. Preferiblemente, al menos aproximadamente 80% de la enzima que está presente y activa en el aditivo antes del calentamiento hasta la temperatura especificada todavía está presente y activa después de que se enfría hasta la temperatura ambiente.

El término "termoestabilidad" es la capacidad de una enzima para resistir la inactivación irreversible (usualmente, por desnaturalización) a una temperatura relativamente alta. Esto significa que la enzima retiene una cantidad especificada de actividad enzimática después de la exposición a una temperatura identificada durante un período de tiempo dado.

Existen muchas maneras de medir la termoestabilidad. Como ejemplo, las muestras de enzimas pueden incubarse sin un sustrato durante un período de tiempo definido (por ejemplo, 10 min o de 1 a 30 min) a una temperatura elevada en comparación con la temperatura a la que la enzima es estable durante un tiempo más prolongado (días). Después de la incubación a temperatura elevada, la muestra de enzima se analiza para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30°C (alternativamente, de 25 a 50°C o incluso hasta 70°C). La actividad residual se calcula en relación con una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada.

La termoestabilidad puede medirse, asimismo, como inactivación de la enzima en función de la temperatura. En este caso, las muestras de enzimas se incuban sin un sustrato durante un período de tiempo definido (por ejemplo, 10 min o de 1 a 30 min) a varias temperaturas y, después de la incubación, se analizan para determinar la actividad residual a la temperatura permitida, por ejemplo, 30°C (alternativamente, de 25 a 70°C o incluso más alta). La actividad residual a cada temperatura se calcula en relación con una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada. El perfil de desnaturalización térmica resultante (la temperatura frente a la actividad residual) se puede utilizar para calcular la temperatura a la que se obtiene 50% de la actividad residual. Este valor se define como el valor de T<sub>m</sub>.

Además, la termoestabilidad puede medirse como la inactivación de la enzima en función del tiempo. En este caso, las muestras de enzimas se incuban sin un sustrato a una temperatura elevada definida (por ejemplo, 76°C) durante varios períodos de tiempo (por ejemplo, entre 10 s y 30 min) y, después de la incubación, se analizan para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30°C (alternativamente, de 25 a 70°C o incluso más alta). La actividad residual a cada temperatura se calcula en relación con una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada. El perfil de inactivación resultante (el tiempo frente a la actividad residual) se puede utilizar para calcular el tiempo en el que se obtiene 50% de la actividad residual. Este se proporciona, usualmente, como T<sub>1/2</sub>.

Estos son ejemplos de cómo medir la termoestabilidad. La termoestabilidad puede medirse, además, con otros métodos. Preferiblemente, la termoestabilidad se evalúa mediante el uso del “ensayo para la medición de la termoestabilidad” como se ilustra en la presente memoria.

- 5 En contraposición con la termoestabilidad, la termoactividad es la actividad de la enzima en función de la temperatura. Para determinar la termoactividad, las muestras de enzimas pueden incubarse (analizarse) durante el período de tiempo definido por el ensayo a varias temperaturas en presencia de un sustrato. La actividad enzimática se obtiene durante o inmediatamente después de la incubación según lo definido por el ensayo (por ejemplo, la lectura de un valor de DO que refleja la cantidad de producto de reacción formado). La temperatura a la que se obtiene la actividad más alta es la temperatura óptima de la enzima en las condiciones de ensayo dadas. La actividad obtenida a cada temperatura puede calcularse en relación con la actividad obtenida a la temperatura óptima. Esto proporcionará un perfil de temperatura para la enzima en las condiciones de ensayo dadas.

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

Convenientemente, la xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención tiene un pH óptimo en el intervalo de 4,6 a 7, preferiblemente, de aproximadamente 5 a 6.

- 15 En una realización preferida, la xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención comprende una de las secuencias de aminoácidos que se muestran en la presente memoria como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21, o un fragmento de la mismas, que tiene actividad xilanasa.

En una realización, las modificaciones en la secuencia de polinucleótidos esqueleto son tales que proporcionan las modificaciones detalladas anteriormente en la secuencia de aminoácidos codificada:

- 20 Los métodos de la presente invención son adecuados para proporcionar las modificaciones como se instruyó anteriormente en la secuencia de polinucleótidos o aminoácidos.

La célula anfitriona de la presente invención se puede seleccionar del grupo que consiste en una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula fúngica filamentosa y una célula vegetal. Preferiblemente, la célula anfitriona es una célula bacteriana o fúngica.

- 25 En una realización preferida se recupera la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención producida de acuerdo con un método descrito en la presente memoria.

- 30 En una realización preferida se aísla y/o purifica la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención producida de acuerdo con un método descrito en la presente memoria.

En algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se puede utilizar directamente como un producto fermentado sin aislamiento y/o purificación de la enzima.

- 35 En algunas realizaciones, la composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención o la premezcla de acuerdo con la presente invención comprende, adicionalmente, 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  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)).

- 40 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se puede utilizar en un método para degradar material que contiene arabinoxilano en un material que contiene xilano.

Convenientemente, el arabinoxilano puede ser arabinoxilano insoluble (AXinsol).

- 45 En una realización, el material que contiene xilano se selecciona de uno o más del grupo que consiste en un pienso o alimento para animales; un componente para pienso; un material a base de grano; un producto macerado; un mosto; una malta; cebada malteada; un agente adicional, un producto macerado de cebada; y una harina de cereal.

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

En una realización de la presente invención, el pienso o alimento para animales o componente para 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 alimento para animales es un alimento para animales basado en maíz.

- 50 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención se pueden utilizar combinados con 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  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y  $\gamma$ -amilasas (E.C. 3.2.1.3)).

5 En una realización, el método o uso de acuerdo con la presente invención comprende administrar a un sujeto una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención, o un producto fermentado que comprende esa enzima de acuerdo con la presente invención, o una composición enzimática que comprende esa enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención, o una composición de aditivo para pienso que comprende dicha enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención, o una premezcla que comprende dicha enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención o un alimento para animales que comprende dicha enzima xilanasa de acuerdo con la presente invención.

En una realización, el método o uso de la presente invención es (o es parte de) un procedimiento de separación de almidón del gluten de trigo.

15 En otra realización, el método o uso de la presente invención es (o es parte de) un procedimiento de producción de un biocombustible (por ejemplo, bioetanol) o compuesto bioquímico (por ejemplo, isopreno de base biológica).

En otra realización, el método o uso de la presente invención es (o es parte de) un procedimiento de elaboración de cerveza o malta.

20 Convenientemente, se describe en la presente memoria una bebida fermentada, por ejemplo, cerveza, producida por un método de acuerdo con la presente invención.

En una realización, la enzima xilanasa parental de la presente invención puede mencionarse en la presente memoria como FveXyn4.

Las secuencias de polipéptidos y las secuencias de ácido nucleico que se ilustran en la presente memoria están, preferiblemente, aisladas.

25 La xilanasa de la presente invención es una xilanasa GH10. En otras palabras, la xilanasa puede tener un peso molecular en el intervalo de 32-39 kDa y/o el dominio catalítico de la xilanasa consiste en una estructura de barril  $\beta/\alpha$  de ocho pliegues (como ilustran Harris *et al*, en 1996 - Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

30 En un aspecto de la invención, la xilanasa de la invención es una xilanasa de la Familia 10 de las glucósido hidrolasas (GH). El término "de la Familia 10 de las glucósido hidrolasas (GH)" significa que la xilanasa en cuestión es de, o puede clasificarse en, la familia 10 de GH.

Las búsquedas de similitud entre proteínas (por ejemplo, Blast para proteínas en [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE\\_TYPE=BlastHome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome)) pueden determinar si una secuencia desconocida cae dentro del término de un miembro de la familia de xilanasas GH10, particularmente, las familias GH pueden categorizarse según la homología de secuencias en regiones clave. Adicional o alternativamente, para determinar si una secuencia de proteínas desconocida es una proteína xilanasa dentro de la familia GH10, la evaluación puede hacerse no solo para la similitud/homología/identidad de secuencias, sino, además, para la similitud de estructuras 3D. La clasificación de familias GH está basada, frecuentemente, en el plegamiento 3D. El programa informático que predice el plegamiento 3D de una secuencia de proteínas desconocida es HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>). La potencia de este programa para predecir la estructura de las proteínas depende de la identificación de secuencias homólogas con estructura conocida que se van a utilizar como molde. Esto funciona bien porque las estructuras divergen mucho más lentamente que las secuencias primarias. Las proteínas de la misma familia pueden tener estructuras muy similares aun cuando sus secuencias hayan divergido más allá del reconocimiento.

45 En la práctica, puede "pegarse" una secuencia desconocida en el programa informático (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) en el formato FASTA. Una vez hecho esto, puede enviarse la búsqueda. El resultado de la búsqueda mostrará una lista de secuencias con estructuras 3D conocidas. Para confirmar que la secuencia desconocida es, efectivamente, una xilanasa GH10, las xilanasas GH10 pueden encontrarse dentro de la lista de homólogos que tienen una probabilidad de > 90. No todas las proteínas identificadas como homólogas se caracterizarán como xilanasas GH10, pero algunas lo harán. Las proteínas mencionadas en último término son proteínas con una estructura conocida y caracterizadas bioquímicamente que las identifica como xilanasas. Las mencionadas en primer término no han sido caracterizadas bioquímicamente como xilanasas GH10. Varias referencias describen este protocolo, tales como Söding J. (2005) Protein homology detection by HMM-HMM comparison - Bioinformatics 21, 951-960 (doi:10.1093/bioinformatics/bti125) y Söding J, Biegert A, y Lupas AN. (2005) The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction - Nucleic Acids Research 33, W244--W248 (Web Server issue) (doi:10.1093/nar/gki40).

De acuerdo con el sitio Cazy (<http://www.cazy.org/>), la Familia 10 de glucósido hidrolasas puede caracterizarse de la siguiente forma:

Actividades conocidas: endo-1,4- $\beta$ -xilanasas (EC 3.2.1.8); endo-1,3- $\beta$ -xilanasas (EC:3.2.1.32); tomatinasas (EC 3.2.1.-)

Mecanismo: Retención

5 Clan: GH-A

Base/nucleófilo catalítico Glu (experimental)

Donador de protones catalítico: Glu (experimental)

Estado de la estructura 3D: ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub>

10 La xilanasas GH10 de la presente invención puede tener un dominio catalítico con pesos moleculares en el intervalo de 32 a 39 kDa. La estructura del dominio catalítico de la xilanasas GH10 de la presente invención consiste en un barril  $\beta/\alpha$  de 8 pliegues (Harris *et al* 1996 – Acta. Crystallog. Sec. D 52, 393-401).

15 Las estructuras tridimensionales están disponibles para un gran número de enzimas de la Familia GH10, las primeras resueltas son aquellas de la xilanasas A de *Streptomyces lividans* (Derewenda *et al*, J Biol Chem 19 de agosto de 1994; 269(33) 20811-4), la endoglucanasa Cex de *C. fimi* (White *et al* Biochemistry, 25 de octubre de 1994; 33(42) 12546-52) y la Xyn10A de *Cellvibrio japonicus* (anteriormente, la *Pseudomonas fluorescens* subesp. xilanasas A) (Harris *et al* Structure 15 de noviembre de 1994; 2(11) 1107-16). Como miembros del Clan GHA, tienen un plegamiento de barril TIM clásico ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> con los dos ácidos glutámicos clave del sitio activo ubicados en los extremos C-terminales de las hebras beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo) (Henrissat *et al*, Proc Natl Acad Sci U S A 18 de julio de 1995; 92(15) 7090-4).

20 El término “xilanasas GH10”, como se emplea en la presente memoria, significa un polipéptido que tiene actividad xilanasas y que tiene un plegamiento de barril TIM ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> con los dos ácidos glutámicos clave del sitio activo ubicados en los extremos C-terminales de las hebras beta 4 (ácido/base) y 7 (nucleófilo).

Puede hacerse referencia a la enzima xilanasas esqueleto (o parental) utilizada en la presente memoria como FveXyn4 o FoxXyn 2 (estos términos se refieren a las proteínas activas, por ejemplo, las proteínas maduras).

25 En una realización, preferiblemente, la xilanasas es una xilanasas fúngica.

La enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención y/o enzima parental es una xilanasas GH10.

30 En una realización, preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención (y/o xilanasas parental) es una xilanasas GH10 fúngica.

35 En una realización, preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención (y/o xilanasas parental) es una endoxilanasas, por ejemplo, una endo-1,4- $\beta$ -d-xilanasas. La clasificación para una endo-1,4- $\beta$ -d-xilanasas es E.C. 3.2.1.8.

En algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención tiene un pH óptimo a aproximadamente 6.

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

En algunas realizaciones, por ejemplo, en aplicaciones para pienso, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención retiene, preferiblemente, más de 70% de la actividad máxima entre 5,1 y 7.

45 Sin intención de restringirse por la teoría, el pH puede tener, además, un efecto importante en la eficiencia y eficacia de la enzima. Para aplicaciones para pienso particularmente, el perfil de pH de las xilanasas de la presente invención favorece la actividad en el intestino delgado, en condiciones neutras.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención es capaz de degradar

(o degrada) un material que contiene xilano, particularmente, arabinosilanos, particularmente, arabinosilanos insolubles (AXinsol).

5 En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención es capaz de degradar (o degrada) polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol o que están presentes (naturalmente) en el material a base de grano.

10 En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención es capaz de degradar (o degrada) un material que contiene xilano, particularmente, arabinosilanos, particularmente, AXinsol, y polímeros solubles (por ejemplo, oligómeros) que se producen a partir de la degradación de AXinsol.

15 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención no es afectada por los inhibidores de xilanasas de trigo, por ejemplo, inhibidores proteicos, por ejemplo, inhibidores proteicos de tipo TAXI en trigo. Las xilanasas fúngicas de la técnica anterior pueden inhibirse en tanto como 70-95% por los inhibidores proteicos del trigo. Preferiblemente, las xilanasas de la presente invención se inhiben solamente en 20-30% en la mayoría de las aplicaciones de trigo.

TAXI son los inhibidores de xilanasas de *Triticum aestivum*, presentes en cereales.

20 El término “que consiste esencialmente en”, como se emplea en la presente memoria, significa que los componentes no especificados pueden estar presentes si las características de la composición reivindicada no resultan, por lo tanto, materialmente afectadas.

El término “que consiste en” significa que las proporciones de los ingredientes específicos deben dar un total de 100%.

El término “que comprende”, utilizado en la presente memoria, puede modificarse en algunas realizaciones para referirse a que consiste esencialmente en o que consiste en (ambos con un significado más limitado que “que comprende”).

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

30 El término “fragmento de la misma”, como se emplea en la presente memoria, significa un fragmento activo. En otras palabras, el fragmento es un fragmento que tiene actividad xilanasa. Consecuentemente, el fragmento puede tener la misma actividad xilanasa que la enzima xilanasa GH10 modificada completa de la cual deriva el fragmento. Alternativamente, el fragmento puede tener una actividad modificada (por ejemplo, especificidad, actividad específica, pH o perfil de temperatura mejorados) en comparación con la enzima xilanasa GH10 modificada completa de la cual deriva el fragmento. Adicionalmente, el fragmento debe retener las propiedades de termoestabilidad de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual es un fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos 60% de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

35 En una realización, el fragmento es al menos 75% de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos 85% de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

40 En una realización, el fragmento es al menos 95% de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es al menos 98% de la longitud completa de la enzima xilanasa GH10 modificada de la cual deriva el fragmento.

En una realización, el fragmento es un fragmento de una o más de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID No. 17, SEQ. ID. No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21.

45 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma de acuerdo con la presente invención a) comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la presente memoria como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21, o b) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 96%, preferiblemente, al menos 98,5% de identidad con las secuencias de aminoácidos mostradas en la presente memoria  
50 como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21, siempre que los aminoácidos en las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 sean idénticos a los mostrados en SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21.

- En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención o un vector o construcción que la comprende, en donde la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en: SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 y SEQ ID No. 16; o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 96%, preferiblemente, 98,5%, de identidad con las secuencias de nucleótidos mostradas en la presente memoria como SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 o SEQ ID No. 16, siempre que los codones que codifican las posiciones de aminoácidos 7, 33, 79, 217 y 298 en la proteína madura sean los mismos que aquellos de SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15 o SEQ ID No. 16.
- 5 El término “que modifica”, como se emplea en la presente memoria, significa que cambia o altera. Particularmente, el término “que modifica”, como se emplea en la presente memoria, significa que altera con respecto a lo que se encuentra en la naturaleza. En otras palabras, al modificar la enzima, la enzima se modifica de tal manera que queda alterada con respecto a la enzima esqueleto parental. Preferiblemente, la enzima modificada no existe como tal en la naturaleza. Por lo tanto, la enzima modificada es una enzima que no es de origen natural.
- 10 El término “modificada”, como se emplea en la presente memoria, significa alterada, por ejemplo, con respecto a su forma de origen natural. Las enzimas modificadas de acuerdo con la presente invención son, preferiblemente, enzimas que no son de origen natural o variantes de un origen natural. En otras palabras, las enzimas modificadas de acuerdo con la presente invención son, preferiblemente, enzimas modificadas que no se encuentran en la naturaleza. Preferiblemente, las enzimas modificadas de la presente invención no aparecen espontáneamente.
- 15 En algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se prepara al modificar una enzima parental o una enzima esqueleto. Sin embargo, en otras realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se prepara sin modificar una enzima parental o una enzima esqueleto, por ejemplo, puede prepararse sintéticamente. El término “xilanasa modificada” o “xilanasa GH10 modificada”, como se emplea en la presente memoria, no determina que la xilanasa se ha preparado por mutación de una enzima parental. La xilanasa modificada puede haberse preparado adecuadamente por otros métodos, por ejemplo, sintéticamente.
- 20
- 25
- Usos
- La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se puede utilizar convenientemente en cualquiera de las aplicaciones siguientes:
- 30
- a) Un aditivo en alimentos para animales; y/o
- b) Un suplemento de pienso para un animal; y/o
- 35
- c) La descomposición del material a base de grano (por ejemplo, este puede ser de grano entero o parte del grano). Los productos de descomposición (por ejemplo, glucosa) se pueden utilizar como materia prima para cualquier procedimiento de fermentación, tal como en la producción de biocombustibles (por ejemplo, bioetanol) o en la producción de otros productos tales como compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica). Por lo tanto, en una realización, la presente invención se refiere a la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) y al uso mejorado de materiales a base de grano en la industria de los biocombustibles; y/o
- 40
- d) La industria de separación del almidón de cereales (por ejemplo, trigo) del gluten. El producto o los productos resultantes pueden ser almidón (por ejemplo, almidón purificado) y/o gluten y/o fibras y/o sustancias solubles en agua (tales como pentosanas solubles). En una realización, la presente invención se refiere a la producción de almidón y/o gluten; y/o
- 45
- e) La mejora en la elaboración de cerveza y malta, por ejemplo, por la descomposición de material a base de grano (por ejemplo, cebada malteada) y/o
- f) para degradar AXsol o los productos de descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o la viscosidad se reduzca en la mezcla de reacción;
- g) para reducir la viscosidad cuando se degradan materiales a base de grano, por ejemplo, en procedimientos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).
- 50 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se utiliza en un alimento para animales. Preferiblemente, un alimento para animales comprende maíz o es un alimento para animales basado en maíz.

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se utiliza en la elaboración de cerveza o malta.

5 En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se utiliza en la separación del almidón del trigo del gluten.

10 En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se utiliza en la descomposición de material a base de grano y puede ser parte del procedimiento de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

#### Ventajas

La enzima novedosa que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma ilustrada en la presente memoria tiene muchas ventajas en comparación con las xilanasas conocidas.

15 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención es termoestable. Por ejemplo, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención es significativamente más estable que la xilanasa parental (esqueleto) antes de la modificación. Convenientemente, la xilanasa modificada tiene un valor de T<sub>m</sub> mayor que 70°C (preferiblemente, mayor que 75°C), en donde el valor de T<sub>m</sub> se mide como la temperatura a la cual se obtiene 50% de actividad residual después de 10 min de incubación.

20 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención es, además, inesperadamente adecuada para solubilizar pentosanas.

25 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención es inesperadamente adecuada para solubilizar AXinsol.

30 Sorprendentemente, se ha descubierto que la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención es particularmente adecuada para degradar materiales que contienen arabinoxilanos, por ejemplo, AXinsol, en un amplio espectro de sustratos, maíz, trigo, DDGS, etc., particularmente, sustratos de maíz y a base de maíz, particularmente, productos de trigo (que incluyen aquellos a base de trigo) y de maíz (que incluyen aquellos a base de maíz). En comparación con las xilanasas de referencia que son todas xilanasas producidas y distribuidas comercialmente, la xilanasa novedosa ilustrada en la presente memoria tenía una mayor capacidad para degradar y liberar pentosana con una eficacia mucho mayor a partir de más materiales basados en plantas (particularmente, sustratos a base de maíz) en comparación con las xilanasas comercializadas. Esto resultó ser totalmente inesperado. Esto contrasta con las enzimas conocidas anteriormente que son, frecuentemente, inferiores con respecto a la solubilización de AXinsol en sustratos de maíz o a base de maíz o que no son tan eficaces en sustratos a base de trigo y a base de maíz.

35 Además, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención es particularmente adecuada con respecto a la descomposición (solubilización) de AXinsol y, además, en la descomposición (o degradación) eficaz de los polímeros solubilizados. La capacidad de descomponer (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (obtenidos a partir de la disolución del AXinsol) permite obtener una reducción de la viscosidad. Este último efecto es esencial en algunas de las aplicaciones reivindicadas.

40 Típicamente, las xilanasas convencionales pueden descomponer el AXinsol, pero, esto conducirá a un aumento en los productos de producción de polímeros y, en consecuencia, a un aumento en la viscosidad de la mezcla. Esta mayor viscosidad es una desventaja en muchas aplicaciones.

45 Se ha descubierto que la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y descrita en la presente memoria no solo descompone (solubiliza) los arabinoxilanos insolubles (AXinsol) a partir de una amplia variedad de sustratos, que incluyen maíz, trigo, DDGS, etc., particularmente sustratos de maíz y a base de maíz, particularmente, productos de trigo (que incluyen aquellos a base de trigo) y maíz (que incluyen los productos a base de maíz), sino, además, descompone eficazmente los polímeros solubilizados de esta manera para asegurar que la viscosidad no aumente y/o para reducir la viscosidad.

50 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y como se describe en la presente memoria tiene

la capacidad de degradar AXsol o los productos de la descomposición de AXinsol para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o la viscosidad se reduzca en la mezcla de reacción.

5 Muchas de las xilanasas comercializadas para su uso en alimentos para animales para solubilizar pentosanas son enzimas GH11. Los expertos en la técnica han considerado que las xilanasas GH10 no eran tan fuertes en la solubilización de las pentosanas, particularmente, AXinsol, en comparación con las xilanasas GH11. Sorprendentemente, se ha descubierto que una o más xilanasas modificadas novedosas descritas en la presente memoria, que son xilanasas GH10, son particularmente adecuadas para solubilizar AXinsol en un amplio espectro de sustratos, que incluyen los sustratos a base de maíz. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que las xilanasas GH10 modificadas de la presente invención (y que se ilustran en la presente memoria) 10 tienen mejor rendimiento que las xilanasas GH11 comerciales con respecto a su capacidad para solubilizar pentosanas.

El hecho de que las presentes enzimas solubilicen eficazmente el AXinsol a partir de sustratos de maíz y a base de maíz es significativamente ventajoso ya que el maíz contiene mucho más AX en la forma insoluble en comparación con otros cereales, tales como, por ejemplo, trigo y centeno. Por lo tanto, solo las xilanasas que pueden descomponer el AXinsol pueden mostrar un beneficio significativo para los animales alimentados con una dieta de maíz-soja, por ejemplo. 15

Era completamente inesperado que una xilanasas GH10 fuera tan adecuada para solubilizar el AXinsol en cereales, particularmente, en sustratos de maíz y a base de maíz.

Las enzimas de la presente invención son capaces de degradar eficazmente (y rápidamente) los polímeros y/u oligómeros producidos a partir de la solubilización del AXinsol o que están presentes en materiales a base de granos. Esto conduce a una ventaja inesperada para las xilanasas GH10 modificadas ilustradas en la presente memoria que consiste en que son particularmente adecuadas en varias aplicaciones para mantener la viscosidad baja o para reducir la viscosidad, por ejemplo, en alimento para animales; en la elaboración de cerveza y/o malta; en la producción de glucosa basada en granos, por ejemplo, para el procesamiento adicional a biocombustibles y/o compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica); o en la industria de la separación del almidón del gluten de trigo, por ejemplo, para la producción de almidón. 20 25

Además, la xilanasas GH10 modificada de la presente invención es particularmente termoestable. Esto proporciona ventajas significativas en algunas aplicaciones. Particularmente, en aplicaciones para pienso, las enzimas pueden someterse al tratamiento térmico, por ejemplo, durante los procedimientos de peletización. Por lo tanto, es necesario que las enzimas tengan la capacidad de mantener su actividad después de dicho procesamiento. Las xilanasas modificadas de la presente invención son particularmente e inesperadamente termoestables. 30

Asimismo, una termoestabilidad mejorada es, además, muy beneficiosa durante la degradación de almidón, que se produce a temperaturas elevadas durante la licuefacción (alrededor de 85-95°C). La termoestabilidad permite la adición de la enzima durante esta etapa.

35 Notablemente, se ha descubierto que el producto de degradación a partir del uso de la xilanasas modificada de promedio es más corto para las enzimas GH10 probadas en la presente memoria en comparación con las enzimas GH11. Esto mejora la reducción del efecto de la viscosidad.

Además, una ventaja adicional de la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (a diferencia de muchas xilanasas GH11) es que no es afectada por los inhibidores de xilanasas de trigo, por ejemplo, inhibidores proteicos de tipo TAXI, que se producen en el trigo. 40

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

La enzima de la presente invención es particularmente eficaz para mejorar la capacidad de un sujeto o mejorar la digestibilidad de una materia prima en un pienso y/o para mejorar la eficacia del pienso en un sujeto.

45 Material que contiene xilano

La enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la xilanasas modificada de la presente invención) se puede utilizar para degradar cualquier material que contiene xilano.

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

50 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 componente de un alimento para animales o pienso.

En una realización, el material que contiene xilano es un material a base de grano (que incluye granos enteros o partes de granos o granos malteados, por ejemplo, cebada malteada). Cuando el método se refiere a la producción de biocombustibles (por ejemplo, producción de bioetanol), en ese caso, preferiblemente, el material que contiene xilano es un material a base de grano.

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

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 procedimiento de separación del almidón del gluten, preferiblemente, el material que contiene xilano es una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo, avena, centeno o cebada).

10

Descomposición o degradación

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la enzima) se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol o AXsol o los productos de degradación de AXinsol.

- 15 Los términos “descomponer” o “degradar” son sinónimos de hidrólisis.

Solubilización/degradación

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 pentosanas solubles (que pueden ser poliméricas, oligoméricas o monoméricas).

- 20 Este método puede describirse en la presente memoria como solubilización de pentosana o solubilización de arabinoxilano o solubilización de AXinsol o degradación de AXinsol.

En una realización, la presente invención se refiere a un método para degradar (o descomponer) arabinoxilano insoluble (AXinsol). Además, esto puede mencionarse como solubilización de arabinoxilano insoluble y/o solubilización de pentosanas.

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

Arabinoxilano (AX)

El término “arabinoxilanos” (AX), como se emplea en la presente memoria, significa un polisacárido que consiste en un esqueleto de xilano (unidades de xilosa con enlaces 1,4) con L-arabinofuranosa (L-arabinosa en su forma de anillo de 5 átomos) unido aleatoriamente por 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 encontrada en las paredes celulares primarias y secundarias de las plantas. El arabinoxilano puede encontrarse en el salvado de granos tales como trigo, maíz dulce (maíz), centeno y cebada.

30

El arabinoxilano (AX) se encuentra en estrecha asociación con la pared celular de la planta, en la que este actúa como un pegamento que conecta diversas unidades estructurales del tejido y pared celular de la planta, y les proporciona resistencia y rigidez estructural.

35

El término “pentosana”, como se emplea en la presente memoria, es cualquiera de un grupo de carbohidratos que produce pentosas en la hidrólisis completa.

Dado que la xilosa y arabinosa (los constituyentes de arabinoxilanos) son pentosas, los arabinoxilanos se clasifican, usualmente, como pentosanas.

- 40 AX es la fracción de polisacárido no amiláceo (NSP, por sus siglas en inglés) principal en varias de las materias primas de pienso más importantes, que incluyen trigo y maíz.

Su abundancia, ubicación dentro del material vegetal y estructura molecular hacen que el AX tenga un impacto negativo severo en la digestibilidad del pienso y reduzca eficazmente el valor nutricional de las materias primas en las cuales está presente. Esto hace que el AX sea un factor antinutricional importante, y reduzca la eficacia de la producción de animales.

45

Además, el AX puede tener un impacto negativo severo cuando se intenta descomponer material vegetal, por ejemplo, en procedimientos tales como la elaboración de cerveza, elaboración de malta, fabricación de biocombustibles, y reduce eficazmente la cantidad de sustrato al que puede accederse en el material vegetal no procesado.

Los AX, además, pueden contener cantidades sustanciales de agua (que puede mencionarse como su capacidad de retención de agua); esto puede hacer que los arabinosilanos solubles tengan viscosidad (alta), lo que constituye una desventaja en muchas aplicaciones.

5 El término "hemicelulosa", como se emplea en la presente memoria, significa los componentes polisacáridos de las paredes celulares de la planta distintos a celulosa. El término "hemicelulosa", como se emplea en la presente memoria, puede referirse a polisacáridos en las paredes celulares de las plantas, que son extraíbles por soluciones alcalinas diluidas. Las hemicelulosas comprenden casi un tercio de los carbohidratos en el 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 frutas, tallos de las plantas y cáscaras  
10 de cereales. El xilano es un ejemplo de una pentosana que consiste en unidades de D-xilosa con enlaces  $1\beta\rightarrow4$ .

Arabinosilano insoluble en agua (AXinsol)

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

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

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

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

20 El AXinsol causa el atrapamiento de nutrientes en el pienso. Cantidades grandes de nutrientes muy digeribles, tales como almidón y proteínas, quedan encerradas en grupos de material de pared celular o unidas a cadenas laterales del AX. Estos nutrientes atrapados no estarán disponibles para la digestión y la absorción posterior en el intestino delgado.

Arabinosilano soluble en agua (AXsol)

25 El arabinosilano soluble en agua (AXsol), también conocido como arabinosilano extraíble en agua (WE-AX) puede causar problemas en la producción de biocombustibles, producción de compuestos bioquímicos, procesamiento de carbohidratos y/o elaboración de cerveza y/o malta y/o en pienso, ya que puede causar una mayor viscosidad debido a la capacidad higroscópica del AXsol.

30 En el pienso, el AXsol puede tener un efecto antinutricional, particularmente, en animales monogástricos, ya que causa un aumento considerable en la viscosidad del contenido intestinal, debido a la capacidad higroscópica extraordinaria del AXsol. El aumento en la viscosidad puede afectar la capacidad para digerir el pienso y el uso de nutrientes, ya que puede evitar el mezclado adecuado del pienso con enzimas digestivas y sales biliares y/o reduce la velocidad de disponibilidad y absorción de nutrientes y/o estimula la fermentación en el intestino terminal.

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

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

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

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

40 Sin embargo, además de la cantidad de AXsol presente en el material vegetal, cuando una xilanasas solubiliza AXinsol en el material vegetal, este puede liberar pentosanas 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 peso molecular alto.

45 Una descomposición del AXsol puede disminuir la viscosidad.

Una descomposición del AXsol puede liberar nutrientes.

## Viscosidad

La presente invención se puede utilizar para asegurar que la viscosidad no se incremente y/o para reducir la viscosidad en cualquier procedimiento en el que la capacidad higroscópica del AXsol causa un aumento indeseable en la viscosidad.

- 5 La presente invención se refiere a asegurar que la viscosidad no se incremente y/o a reducir la viscosidad por la descomposición (degradación) de AXsol o la descomposición (degradación) de los polímeros y/u oligómeros producidos por medio de la solubilización de AXinsol.

10 Sin intención de restringirse por la teoría, la capacidad de descomponer (degradar) eficazmente (rápidamente) los polímeros solubilizados (por ejemplo, oligómeros) obtenidos a partir de la disolución de AXinsol permite evitar un aumento indeseado en la viscosidad y/u obtener una reducción en la viscosidad. El término "eficazmente", como se emplea en la presente memoria, significa que la enzima es capaz de degradar los polímeros (por ejemplo, oligómeros) que se forman por la solubilización del AXinsol con mayor rapidez que la velocidad con la cual se degrada (o solubiliza) el AXinsol.

La reducción de la viscosidad tiene ventajas en muchas aplicaciones como se ilustra en la presente memoria.

- 15 Un ensayo in vitro que intenta imitar el ambiente en el intestino delgado de una gallina fue descrito originalmente por Bedford & Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). El ensayo consiste en una incubación de dos etapas de un pienso, primero a pH bajo con pepsina seguida de la incubación con pancreatina a pH neutro. Generalmente, se acepta que la viscosidad del sobrenadante después de la incubación final se correlaciona con la viscosidad creada in vivo en los pollos de engorde.

20 Sin aumentar la viscosidad y/o una reducción en la viscosidad como se ilustra en la presente memoria para aplicaciones de pienso significa que la adición de la xilanasa producirá una viscosidad sin modificaciones o una viscosidad menor según se determina por el método descrito en el Ejemplo 1. Sin modificaciones significa que el valor medido, que es el promedio de tres repeticiones, está comprendido dentro de dos desviaciones estándar del valor medido para una muestra de trigo sin la adición de xilanasa.

25 La viscosidad se puede determinar con los siguientes dispositivos: equipo Rapid ViscoAnalyzer (RVA) (por ejemplo, en el procesamiento de bioetanol) y viscosímetro Haake VT550 (Thermofisher) (por ejemplo, en el procesamiento del almidón del gluten de trigo). Ambos dispositivos pueden controlar los perfiles de viscosidad de los procedimientos de etanol combustible y procedimientos de separación de almidón del trigo, para los cuales las condiciones experimentales se ilustran en los Ejemplos 6 y 7, respectivamente.

30 En la presente invención, una reducción en la viscosidad puede calcularse por la comparación de una muestra que comprende la xilanasa de la presente invención (o que se ilustra en la presente memoria) en comparación con otra muestra comparable sin la xilanasa de la presente invención (o que se ilustra en la presente memoria).

35 La comparación de los perfiles de la reducción de viscosidad de la xilanasa de la presente invención con aquellos de las xilanasas de referencia comerciales demuestra el rendimiento de la enzima. El objetivo es mejorar el rendimiento de la enzima en comparación con la referencia comercial. Las enzimas de referencia para las aplicaciones individuales se proporcionan en los ejemplos incluidos más abajo.

La enzima de referencia para comparar la reducción de la viscosidad en aplicaciones de pienso puede ser Econase® XT.

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

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

La enzima de referencia para el análisis de la termoestabilidad puede ser la xilanasa (esqueleto) parental (por ejemplo, antes de la modificación).

En una realización de la presente invención las xilanasas que se ilustran en la presente memoria son reductores de la viscosidad.

45 Generalmente, el trigo (u otro cereal) primero se muele en seco para separar el salvado y el germen del endospermo, que se muele hasta obtener harina. Esta harina del endospermo, después, se fracciona aún más a través de un procedimiento de separación del almidón de trigo en varias corrientes de producto de valor comercial variable. El objetivo principal es producir un grado refinado de almidón A que consiste en gránulos lenticulares grandes de 15-40 µm. La segunda 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 forma la materia prima para la producción de almidón modificado que se puede utilizar en aplicaciones alimenticias y no alimenticias. El gluten vital es el tercer producto de valor añadido en los procedimientos de separación del trigo. La vitalidad del gluten de trigo aislado se determina por la capacidad para formar redes viscoelásticas, necesarias para

50

la panificación. El gluten vital encapsula el dióxido de carbono formado en la preparación de masa durante el horneado y, en consecuencia, aumenta el volumen del pan. (Anne van der Borgh, Hans Goesaert, Wim S. Veraverbeke, Jan A. Delcour, *Journal of Cereal Science* 41 (2005) 221-237, *Fractionation of wheat and wheat flour into starch and gluten: overview of the main processes and the factors involved*). Por lo tanto, frecuentemente, se utiliza para enriquecer harinas para la panificación, para obtener productos panificados mejorados. Otros mercados para el gluten incluyen como aditivo en productos vegetarianos, carne, pescado o pollo, que incluyen aquellos utilizados en la industria de los alimentos para mascotas; en cereales para desayuno; o en salsa de soja. Debido a su termoplaticidad y propiedades formadoras de película adecuadas, el gluten se usa, además, en los mercados no alimenticios 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 modificadas ilustradas en la presente memoria se pueden utilizar para reducir la viscosidad (o no aumentar la viscosidad) en procedimientos para separar harina de cereales (por ejemplo, harina de trigo, avena, centeno o cebada) en fracciones de almidón y gluten y para mejorar la separación por la degradación de oligosacáridos que obstaculizan la aglomeración del gluten.

La viscosidad del mosto y la viscosidad de la pasta de cebada y la malta de cebada en la elaboración de cerveza y malta pueden causar desventajas significativas durante la elaboración de cerveza y/o malta. La presente invención se refiere a la reducción de la viscosidad (o el no aumento de la viscosidad) del mosto, la pasta de cebada, la malta de cebada o una combinación de los mismos.

Pienso o alimento para animales

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición de aditivo para pienso de la presente invención se puede utilizar como o en la preparación de un pienso.

El término "pienso" se utiliza en la presente memoria como sinónimo de "alimento para animales".

Preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano de la presente invención es un alimento para animales o un constituyente de un alimento para animales, o un componente para pienso.

El pienso puede estar en forma de una solución o como un sólido o un semisólido, dependiendo del uso y/o modo de aplicación y/o el modo de administración.

Cuando se utiliza como pienso o en la preparación de pienso, tal como pienso funcional, la enzima o composición de la presente invención se puede utilizar junto con uno o más de un portador 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 para pienso para formar un alimento para animales.

El término "componente para pienso", como se emplea en la presente memoria, significa todo o parte del alimento para animales. Parte del alimento para animales puede significar un constituyente del alimento para animales o más de un constituyente del alimento para animales, por ejemplo, 2 o 3 o 4. En una realización, el término "componente para pienso" abarca una premezcla o constituyentes de la premezcla.

Preferiblemente, el pienso puede ser un forraje o una premezcla de este, un pienso compuesto o una premezcla de este. En una realización, la composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención puede mezclarse con un pienso compuesto, un componente para pienso compuesto o a una premezcla de un pienso compuesto o a un forraje, un componente de forraje o una premezcla de un forraje.

El término "forraje", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier alimento proporcionado a un animal (en lugar de que el animal tenga que buscarlo). Forraje abarca plantas que han sido cortadas.

El término forraje incluye ensilado, piensos comprimidos y granulados, aceites y raciones mixtas y, además, granos germinados y legumbres.

El forraje puede obtenerse a partir de una o más plantas seleccionadas entre maíz (maíz dulce), alfalfa (forraje de alfalfa), cebada, pata de pájaro, brassicas, Chau moellier, col rizada, semilla de colza (canola), colinabo (nabo sueco), nabo, trébol, trébol de Suecia, trébol común, trébol subterráneo, trébol blanco, festuca, bromus, mijo, avena, sorgo, haba de soja, árboles (brotes de árboles podados para heno de árboles), trigo y legumbres.

El término "pienso compuesto" significa un pienso comercial en forma de una harina, un pélet, nueces, torta o un budín. Los piensos compuestos pueden ser una combinación de varias materias primas y aditivos. Estas combinaciones se formulan de acuerdo con los requisitos específicos del animal objetivo.

Los piensos compuestos pueden ser piensos completos que proporcionan todos los nutrientes requeridos diariamente, productos concentrados que proporcionan una parte de la ración (proteína, energía) o complementos que solo proporcionan micronutrientes adicionales, tales como minerales y vitaminas.

5 Los ingredientes principales utilizados en el pienso compuesto son los granos para pienso que incluyen maíz, trigo, harina de canola, harina de colza, altramuz, habas de soja, sorgo, avena y cebada.

Convenientemente, una premezcla tal como se menciona en la presente memoria puede ser una composición compuesta de microingredientes tales como vitaminas, minerales, conservantes químicos, antibióticos, productos de fermentación y otros ingredientes esenciales. Las premezclas son, usualmente, composiciones adecuadas para combinar en raciones comerciales.

10 Cualquier alimento para animales de la presente invención puede comprender uno o más materiales para 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 harina de gluten de maíz, torta húmeda (particularmente, torta húmeda a base de maíz), granos secos de destilería (DDG) (particularmente, granos secos de destilería a base de maíz (cDDG)), materia soluble de granos secos de destilería (DDGS) (particularmente, materia soluble de granos secos de destilería a base de maíz (cDDGS)), salvado de trigo, acemite de trigo, moyuelos de trigo, salvado de arroz, cascarillas de arroz, cascarillas de avena, nuez de palma y pulpa de cítricos; c) proteína obtenida de fuentes tales como soja, girasol, cacahuete, altramuz, guisantes, habas, algodón, canola, harina de pescado, proteína de plasma seco, harina de carne y huesos, proteína de patata, suero de leche, copra, sésamo; d) aceites y grasas de origen vegetal y animal; e) minerales y vitaminas.

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

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

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

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

30 Un alimento para animales de la presente invención puede contener al menos 30%, al menos 40%, al menos 50% o al menos 60% en peso de maíz y harina de soja o maíz y harina de soja no desgrasada, o harina de trigo o harina de girasol.

Un alimento para animales de la presente invención puede contener de aproximadamente 5 a aproximadamente 40% de DDGS de maíz. Para aves de corral: el alimento para animales puede contener en promedio de aproximadamente 7 a 15% de DDGS de maíz. Para el ganado porcino (cerdos): el alimento para animales puede contener en promedio de 5 a 40% de DDGS de maíz.

35 Un alimento para animales de la presente invención puede contener maíz como un solo grano, en cuyo caso el alimento para animales puede comprender de aproximadamente 35% a aproximadamente 80% de maíz.

En alimentos para animales que comprenden granos mixtos, por ejemplo, que comprenden maíz y trigo, por ejemplo, el alimento para animales puede comprender al menos 10% de maíz.

40 Además o alternativamente, un alimento para animales de la presente invención puede comprender al menos un material para pienso con alto contenido de fibra y/o al menos un subproducto de al menos un material para pienso con alto contenido de fibra para proporcionar un alimento para animales con alto contenido de fibra. Los ejemplos de materiales para pienso con alto contenido de fibra incluyen trigo, cebada, centeno, avena, subproductos de cereales, tales como harina de gluten de maíz, pienso de gluten de maíz, torta húmeda, granos secos de destilería (DDG), materia soluble de granos secos de destilería (DDGS), salvado de trigo, acemite de trigo, moyuelos de trigo, salvado de arroz, cascarillas de arroz, cascarillas de avena, nuez de palma y pulpa de cítricos. Además, puede considerarse que algunas fuentes de proteínas tienen un contenido alto de fibras: proteína obtenida de fuentes tales como girasol, altramuz, habas y algodón.

50 En una realización, el alimento para animales de la presente invención comprende al menos un material con contenido alto de fibra y/o al menos un subproducto de al menos un material para pienso con contenido alto de fibra seleccionado del grupo que consiste en materia soluble de granos secos de destilería (DDGS), particularmente, cDDGS, torta húmeda, granos secos de destilería (DDG), particularmente, cDDG, salvado de trigo y trigo, por ejemplo.

En una realización, el alimento para animales de la presente invención comprende al menos un material con contenido alto de fibra y/o al menos un subproducto de al menos un material para pienso con contenido alto de fibra seleccionado

del grupo que consiste en materia soluble de granos secos de destilería (DDGS), particularmente, cDDGS, salvado de trigo y trigo, por ejemplo.

5 En la presente invención el pienso puede ser uno o más de los siguientes: un pienso compuesto y premezcla, que incluye pélets, nueces o torta (ganado); un cultivo o residuos de cultivos: maíz, soja, sorgo, avena, cebada, copra, paja, cascarillas, residuos de remolacha azucarera; harina de pescado; harina de carne y de hueso; melaza; torta de aceite y torta de prensa; oligosacáridos; plantas forrajeras conservadas: ensilado; algas; semillas y granos, enteros o preparados mediante compresión, molienda, etc.; granos germinados y legumbres; extracto de levadura.

10 El término “pienso” en la presente invención abarca, en algunas realizaciones, alimentos para mascotas. Un alimento para mascotas es un material de origen vegetal o animal previsto para el consumo por parte de mascotas, tal como alimento para perros o alimento para gatos. El alimento para mascotas, tal como el alimento para perros y gatos, puede estar en una forma seca, tal como alimento granulado para perros o en forma de alimento húmedo enlatado. Los alimentos para gatos pueden contener el aminoácido taurina.

15 El término “pienso” en la presente invención abarca, en algunas realizaciones, alimento para peces. Un alimento para peces contiene, normalmente, macronutrientes, oligoelementos y vitaminas necesarios para mantener a los peces en cautiverio en un buen estado de salud. El alimento para peces puede estar en la forma de una escama, pélet o comprimido. Las formas granuladas, algunas de las cuales se sumergen rápidamente, se utilizan, frecuentemente, para peces más grandes o para especies que se alimentan en el fondo. Algunos alimentos para peces contienen, además, aditivos tales como beta caroteno u hormonas sexuales, para mejorar artificialmente el color de los peces ornamentales.

20 El término “pienso” en la presente invención abarca, en alguna realización, alimento para aves. El alimento para aves incluye alimentos que se utilizan en comederos para aves y también para alimentar aves domésticas. Típicamente, el alimento para aves comprende diversas semillas pero, además, puede incluir sebo (grasa de vacuno o cordero).

25 Como se emplea en la presente memoria, el término “en contacto” se refiere a la aplicación indirecta o directa de la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención al producto (por ejemplo, pienso). Los ejemplos de los métodos de aplicación útiles incluyen, pero no se limitan a, tratamiento del producto en un material que comprende la composición de aditivo para pienso, la aplicación directa mediante el mezclado de la composición de aditivo para pienso con el producto, el rociado de la composición de aditivo para pienso sobre la superficie del producto o la inmersión del producto 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, alimento para animales). Alternativamente, la composición de aditivo para pienso puede incluirse en la emulsión o en los ingredientes crudos de un alimento para animales.

Para algunas aplicaciones, es importante que la composición esté disponible sobre o para la superficie de un producto que se modificará/tratará. Esto permite que la composición imparta una o más de las siguientes características favorables: beneficios de rendimiento.

35 Las enzimas modificadas (o composición que comprende la enzima modificada) de la presente invención pueden aplicarse para entremezclar, recubrir y/o impregnar un producto (por ejemplo, alimento para animales o ingredientes crudos de un alimento para animales) con una cantidad controlada de esa enzima.

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

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

45 En otra realización preferida, cuando la composición de aditivo para pienso de la presente invención se formula en gránulos, los gránulos comprenden una sal de barrera hidratada aplicada como recubrimiento sobre el núcleo de la proteína. La ventaja de ese recubrimiento de sal es una mayor tolerancia térmica, mayor estabilidad en el almacenamiento y protección contra otros aditivos para pienso que, de otra forma, tienen un efecto adverso sobre la enzima.

Preferiblemente, la sal utilizada para el recubrimiento de sal tiene una actividad en agua mayor que 0,25 o una constante de humedad mayor que 60% a 20°C.

50 Preferiblemente, el recubrimiento de sal comprende Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

El método descrito en la presente memoria para preparar una enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención puede comprender, también, la etapa adicional de peletización del polvo. El polvo puede mezclarse con otros componentes conocidos en la técnica. Es posible forzar el polvo o la mezcla que comprende el polvo a través de una matriz y las hebras resultantes se cortan en pélets adecuados de longitud variable.

Opcionalmente, la etapa de peletización puede incluir un tratamiento con vapor de agua o una fase de acondicionamiento antes de la formación de los pélets. La mezcla que comprende el polvo se puede colocar en un acondicionador, por ejemplo, un mezclador con inyección de vapor de agua. La mezcla se calienta en el acondicionador hasta una temperatura específica, tal como de 60 a 100°C; las temperaturas típicas serían de 70°C, 80°C, 85°C, 90°C o 95°C. El tiempo de permanencia puede variar de segundos a minutos e incluso horas. Tal como 5 segundos, 10 segundos, 15 segundos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 30 minutos y 1 hora.

Se entiende que la enzima (o composición que comprende la enzima) de la presente invención es adecuada para añadir a cualquier material para pienso apropiado.

10 El experto en la técnica entenderá que los distintos animales requieren alimentos para animales diferentes, e incluso el mismo animal puede requerir alimentos para animales diferentes en función del propósito para el cual se cría el animal.

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

15 Preferiblemente, el alimento para animales es una mezcla de harina de haba de soja y maíz.

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

Se describe en la presente memoria un método para producir un alimento para animales. El alimento se produce, típicamente, en molinos de pienso en los cuales primero se trituran las materias primas hasta un tamaño de partícula adecuado y, después, se mezclan con los aditivos apropiados. Después, el alimento se puede producir en forma de un producto macerado o pélets; lo último implica, típicamente, pélets; lo últimos implican, típicamente, un método por el cual la temperatura se eleva hasta un nivel objetivo y, después, el alimento se hace pasar a través de una matriz para producir pélets de un tamaño específico. Los pélets se dejan enfriar. Posteriormente, puede añadirse aditivos líquidos, tales como grasa y enzima. Además, la producción de alimento para animales puede implicar también una etapa adicional que incluye la extrusión o expansión antes de la peletización, particularmente, por medio de técnicas adecuadas que pueden incluir al menos el uso de vapor de agua.

El alimento para animales puede ser un alimento para un animal monogástrico, tal como aves de corral (por ejemplo, pollo de granja, gallina ponedora, pollos de engorde, pavo, pato, ganso, ave acuática) y cerdos (todas las categorías de edad), un rumiante, tal como ganado vacuno (por ejemplo, vacas o toros (incluyendo terneros)), caballos, ovejas, una mascota (por ejemplo, perros, gatos) o peces (por ejemplo, peces no gástricos, peces gástricos, peces de agua dulce, tales como salmón, bacalao, trucha y carpa, por ejemplo, carpa koi, peces marinos, tales como róbalo y crustáceos tales como camarones, mejillones y vieiras). Preferiblemente, el alimento es para aves de corral.

Alimento para animales a base de maíz

En una realización preferida, el alimento para animales de la presente invención puede ser un alimento para animales a base de maíz. El término "alimento para animales a base de maíz", como se emplea en la presente memoria, significa un alimento para animales que comprende o consiste en maíz (maíz dulce) o un subproducto de maíz.

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

En algunas realizaciones, el alimento para animales a base de maíz puede comprender maíz o un subproducto de maíz como constituyente minoritario; en cuyo caso el alimento para animales puede complementarse con maíz o un subproducto de maíz. Como ejemplo solamente, el alimento para animales puede comprender, por ejemplo, trigo complementado con maíz o un subproducto de maíz.

Cuando el maíz o el subproducto de maíz es un constituyente minoritario del alimento para animales, el maíz o subproducto de maíz es al menos 5%, preferiblemente, al menos 10%, preferiblemente, al menos 20%, preferiblemente, al menos 30% del alimento para animales.

Para evitar dudas, el término "maíz", como se emplea en la presente memoria, es sinónimo de maíz dulce, por ejemplo, *Zea mays*.

En una realización, el subproducto de maíz puede ser materia soluble de granos secos de destilería (cDDGS) de maíz o torta húmeda de maíz o granos secos de destilería (DDG) de maíz 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 comprende un subproducto de maíz, tal como materia soluble de granos secos de destilería (cDDGS) de maíz o torta húmeda de maíz o granos secos de destilería (DDG) de maíz o harina de gluten de maíz o pienso de gluten de maíz o combinaciones de los mismos.

5 Alimento para animales a base de trigo

En una realización preferida, el alimento para animales de la presente invención puede ser un alimento para animales a base de trigo. El término "alimento para animales a base de trigo", como se emplea en la presente memoria, significa un alimento para animales que comprende o consiste en trigo o un subproducto de trigo.

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

15 En algunas realizaciones, el alimento para animales a base de trigo puede comprender trigo o un subproducto de trigo como constituyente minoritario; en cuyo caso el alimento para animales puede complementarse con trigo o un subproducto de trigo. Solo como ejemplo, el alimento para animales puede comprender, por ejemplo, trigo complementado con trigo o un subproducto de trigo.

20 Cuando el trigo o el subproducto de trigo es un constituyente minoritario del alimento para animales, el trigo o subproducto de trigo es al menos 5%, preferiblemente, al menos 10%, preferiblemente, al menos 20%, preferiblemente, al menos 30% del alimento para animales.

En una realización, el subproducto de trigo puede ser salvado de trigo, acemite de trigo, fibras de trigo, por ejemplo.

25 El salvado es la capa externa dura del grano y consiste en una combinación de aleurona y pericarpio. Junto con el germen, es una parte integral de los granos enteros y, frecuentemente, se produce como un subproducto de la molienda en la producción de granos refinados. Cuando el salvado se extrae de los granos, los granos pierden una parte de su valor nutricional. El salvado está presente en y puede molerse de cualquier grano de cereal, incluyendo arroz, maíz (maíz dulce), trigo, avena, cebada y mijo. El salvado es particularmente rico en fibra dietaria y ácidos grasos esenciales y contiene grandes cantidades de almidón, proteína, vitaminas y minerales dietarios.

El acemite de trigo consiste en partículas gruesas y finas de salvado de trigo y partículas finas de moyuelos de trigo, germen de trigo, harina de trigo y los residuos de "cola del molino".

30 El acemite de trigo es un subproducto económico intermedio entre el alimento para seres humanos y el pienso para animales. En una realización, preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano de la presente invención comprende salvado de trigo y/o acemite de trigo.

Torta húmeda, granos secos de destilería (DDG) y materia soluble de granos secos de destilería (DDGS)

35 La torta húmeda, los granos secos de destilería y la materia soluble de granos secos de destilería son productos obtenidos después de la eliminación de alcohol etílico por medio de destilación a partir de la fermentación de levadura de un grano o una mezcla de granos por métodos empleados en la industria de la destilación de granos.

Los residuos de destilación que provienen de la destilación (por ejemplo, que comprenden agua, restos del grano, células de levadura, etc.) se separan en una parte "sólida" y una parte líquida.

La parte sólida se denomina "torta húmeda" y se puede utilizar en ese estado como pienso para animales.

40 La parte líquida se evapora (parcialmente) en un jarabe (materia soluble).

Cuando la torta húmeda se seca constituye los granos secos de destilería (DDG).

Cuando la torta húmeda se seca junto con el jarabe (materia soluble) constituye granos secos de destilería con materia soluble (DDGS).

La torta húmeda se puede utilizar en operaciones lácteas y en lotes de engorde de ganado vacuno.

45 Los DDGS secos se pueden utilizar en piensos para ganado, por ejemplo, lechero, vacuno y porcino) y piensos para aves de corral.

Los DDGS de maíz son una fuente muy adecuada de proteínas para las vacas lecheras.

Harina de gluten de maíz

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

La CGM es un subproducto en polvo de la industria de la molienda de maíz. La CGM es útil, por ejemplo, en pienso para animales. Se puede utilizar como una fuente de proteínas económica para pienso, tal como alimento para mascotas, pienso para ganado y pienso para aves de corral. Es una fuente especialmente adecuada del aminoácido cisteína, pero debe equilibrarse con otras proteínas para lisina.

5 Composición de aditivo para pienso

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

10 La composición de aditivo para pienso de la presente invención se puede utilizar en la forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de estas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolos ruminales, cápsulas, pélets, comprimidos, polvos, y gránulos que pueden ser humectables, secados por aspersión o liofilizados. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas.

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

15 En la presente memoria se describe a un método para preparar una composición de aditivo para pienso, que comprende mezclar una xilanasa como se ilustra en la presente memoria con un portador, diluyente o excipiente aceptable para pienso y (opcionalmente) envasar.

Premezcla

20 El alimento para animales y/o la composición de aditivo para pienso pueden combinarse con al menos un mineral y/o al menos una vitamina. Las composiciones derivadas de esta manera pueden mencionarse en la presente memoria como una premezcla.

Elaboración de cerveza y malta

25 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la enzima) de la presente invención se pueden utilizar en la elaboración de cerveza y malta.

Los granos de cebada contienen de 1,7 a 4,1% (p/p) de sustancias 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).

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

35 La hidrólisis eficaz de los arabinoxilanos (AXsol) y beta-glucano es importante ya que tales compuestos pueden estar involucrados en los 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 capacidad de filtración y formación de turbidez (Coote, N. & Kirsop, B.H. 1976., *Journal of the Institute of Brewing*, 1976, 82, 34; Izawa, M., Kano, Y. & Kanimura, M. 1991. *Proceedings Aviemore Conference on Malting, brewing and Distilling*, 1990, 427).

En la presente memoria se describe un método para hidrolizar arabinoxilanos (por ejemplo, AXinsol y AXsol) durante la elaboración de cerveza y malta, en donde los granos de trigo, los granos de cebada o una combinación de los mismos, o porciones de los granos de trigo y/o cebada, se mezclan con la xilanasa modificada de la presente invención.

40 En la presente memoria se describe una composición alimenticia que es una bebida, que incluye, una bebida fermentada tal como cerveza y vino, que comprende una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención.

También se describe en la presente memoria una composición alimenticia que es una bebida, que incluye, una bebida fermentada tal como cerveza y vino, que comprende una xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención.

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

50 Como se describe en la presente memoria, la bebida fermentada es cerveza. Se pretende que el término "cerveza" comprenda cualquier mosto fermentado producido por fermentación/elaboración de cerveza con un material vegetal que contiene almidón. Frecuentemente, la cerveza se produce a partir de malta o un material asociado, o cualquier combinación de malta y un coadyuvante como material vegetal que contiene almidón. Como se emplea en la presente

memoria, se entiende que el término “malta” se refiere a cualquier grano de cereal malteado, tal como trigo o cebada malteados.

5 Como se emplea en la presente memoria, el término “material asociado” se refiere a cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar que no es malta, tal como malta de cebada o de trigo. Como ejemplos de materiales asociados se pueden mencionar materiales tales como granos de maíz común, granos de maíz refinado, levadura de cerveza molida, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarada, trigo, almidón de trigo, cereal tostado, copos de cereales, centeno, avena, maíz (maíz dulce), patata, tapioca, mandioca y jarabes, tales como el jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertida, jarabes de cebada y/o trigo, y similares, que se pueden utilizar como fuente de almidón.

10 Como se emplea en la presente memoria, el término “producto macerado” 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 aplastada, cebada aplastada y/u otro material asociado o una combinación de los mismos, mezclada con agua que más tarde se separará en mosto y granos agotados.

15 Como se emplea en la presente memoria, el término “mosto” se refiere al licor no fermentado que queda después de extraer la molienda durante el macerado.

En la presente memoria se describe un método para preparar una bebida fermentada, tal como una cerveza, que comprende mezclar la xilanasa modificada de la presente invención con malta o un material asociado.

20 Los ejemplos de cervezas comprenden: cerveza totalmente malteada, cerveza fabricada según la “Reinheitsgebot”, ale, IPA, lager, bitter, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, casi cerveza, cerveza liviana, cerveza con bajo contenido de alcohol, cerveza baja en calorías, porter, cerveza bock, stout, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta no alcohólico, pero, además, bebidas alternativas de cereal y malta, tales como cervezas de malta alcohólicas aromatizadas con frutas y similares, pero también bebidas de cereal y malta alternativas tales como bebidas de malta aromatizadas con fruta, por ejemplo, aromatizadas con cítricos, tales como bebidas de malta con sabor a limón, naranja, lima o bayas, bebidas de malta aromatizadas con licores, por ejemplo, licores de malta aromatizados con vodka, ron o tequila, o bebidas de malta aromatizadas con café, tales como licor de malta aromatizado con cafeína.

Descomposición de material a base de grano, por ejemplo para la producción de biocombustibles

30 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la enzima) se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol durante el procesamiento de granos, por ejemplo, a partir de material a base de grano. El material a base de grano puede ser granos enteros (por ejemplo, granos de trigo, cebada, centeno, triticale o maíz enteros o mezclas de los mismos) o porciones de los granos enteros o mezclas de los mismos.

35 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la enzima) se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol en materiales a base de grano o granos enteros.

Para evitar dudas, los granos enteros pueden romperse mecánicamente.

40 El material a base de grano puede descomponerse o degradarse hasta glucosa. La glucosa se puede utilizar, posteriormente, como una materia prima para cualquier procedimiento de fermentación, por ejemplo, para la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) y/o la producción de compuestos bioquímicos (por ejemplo, isopreno de base biológica).

El material a base de grano puede ser materia prima para un procedimiento de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

45 Actualmente, la mayor parte del etanol combustible se produce a partir de grano de maíz (maíz dulce), que se muele o tritura, se trata con enzimas amilasas para hidrolizar almidón a azúcares, se fermenta y se destila. Si bien se ha realizado un progreso sustancial en la reducción de costes de la producción de etanol, persisten desafíos sustanciales. Aún se requieren técnicas mejoradas para reducir el coste de las materias primas de biocombustibles para la producción de etanol. Por ejemplo, en la producción de etanol a base de grano la degradación de los arabinosilanos puede aumentar la accesibilidad del almidón.

50 La presente invención proporciona una xilanasa modificada de la presente invención para su uso en la descomposición de hemicelulosas, por ejemplo, arabinosilano, particularmente, AXinsol y AXsol.

Solamente como ejemplo, en la industria del alcohol combustible en Europa, los granos pequeños, como el trigo, cebada y centeno, son materias primas comunes, en los Estados Unidos se utiliza principalmente el maíz. El trigo,

cebada y centeno contienen, junto al almidón, niveles altos de polímeros de polisacáridos no amiláceos (NSP), como celulosa, beta-glucano y hemicelulosa.

La razón a la cual los NSP diferentes están representados difieren para cada materia prima. La siguiente tabla muestra las distintas cantidades de NSP en trigo, cebada y centeno en comparación con algunas otras materias primas.

5 Tabla 1: Polisacáridos no amiláceos presentes en materias primas diferentes (g kg<sup>-1</sup> 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 solubles y no solubles <sup>1</sup>	75	89-99	116-136	144	114	150	113
NSP total	97	107-119	132-152	186	124	232	116
1 Polisacáridos no celulósicos, pentosanas, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas							

10 Los NSP pueden proporcionar una viscosidad alta a los productos macerados de granos. La viscosidad alta tiene un impacto negativo en la producción de etanol ya que limitará la concentración de sólidos que se puede utilizar en la formación de producto macerado y reducirá la eficacia de la energía del procedimiento. Además, las hemicelulosas residuales durante el procedimiento pueden contribuir a la contaminación en cambiadores de calor y equipos de destilación. El mayor impacto de una alta viscosidad se observa cuando un producto macerado se enfría hasta la temperatura de fermentación (32°C). Esto explica la necesidad de reducir la viscosidad en algún momento del procedimiento antes de la etapa de enfriamiento.

15 En la presente memoria se describe un método para degradar material a base de grano que comprende mezclas la xilanasas modificada como se describe en la presente memoria tan pronto como sea posible en el procedimiento de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol), por ejemplo, preferiblemente, durante el mezclado del material a base de grano al inicio del procedimiento. Una ventaja de añadir las xilanasas modificadas como se describe en la presente memoria en una fase temprana en el procedimiento consiste en que las enzimas descomponen la viscosidad inicial.

20 En la presente memoria se describe un método para degradar un material a base de grano que comprende mezclar la xilanasas modificada como se describe en la presente memoria antes o durante la licuefacción, sacarificación, fermentación, sacarificación y fermentación simultáneas, post-fermentación o una combinación de las mismas.

Por lo tanto, en una realización la presente invención se refiere a la reducción de la viscosidad cuando se degradan materiales a base de grano, por ejemplo, en procedimientos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol).

25 Los beneficios de utilizar la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y que se ilustra en la presente memoria para reducir la viscosidad cuando se degradan materiales a base de grano, por ejemplo, en procedimientos de producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol) son múltiples:

- Se puede utilizar un producto macerado con más sustancia seca en el procedimiento
- Se puede obtener un jarabe final con un contenido de sólidos más alto
- 30 • Mayor transferencia de calor, menor requerimiento de energía
- Menor contaminación del evaporador que reduce los costes de limpieza
- Mayor producción de etanol final
- Mejor calidad de los DDGS (subproducto)
- Mejor separación entre la parte sólida y líquida durante la separación de los bagazos (después de la destilación).

35 La viscosidad menor aumenta la eficacia de la separación.

Otra ventaja importante de la presente invención es que el uso de la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención en la producción de biocombustibles puede dar como resultado (sub)productos mejorados a partir de ese

- procedimiento, tales como torta húmeda, granos secos de destilería (DDG) o materia soluble de granos secos de destilería (DDGS). Por lo tanto, una ventaja de la presente invención consiste en que dado que la torta húmeda, los DDG y los DDGS son (sub)productos de la producción de biocombustible (por ejemplo, bioetanol), el uso de la presente invención puede mejorar la calidad de estos (sub)productos. Por ejemplo, los arabinoxilanos en los (sub)productos pueden estar ya disueltos durante el procedimiento de producción de biocombustibles.
- 5 Separación del gluten-almidón del cereal (por ejemplo, trigo)
- La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención (o composición que comprende la enzima) de la presente invención o como se describe en la presente memoria se puede utilizar para descomponer (degradar) AXinsol y AXsol durante la separación del gluten y almidón de trigo.
- 10 Después de la separación inicial del salvado de trigo y germen del endospermo, el fraccionamiento de la harina del endospermo de trigo en fracciones de almidón y gluten se aplica industrialmente a gran escala para obtener almidón A de calidad alta y subproductos de almidón B y gluten vital.
- 15 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).
- Además, se producen los subproductos almidón B y gluten vital. Después, cada producto individual se procesa adicionalmente para complementar o modificar las características del producto alimenticio para las necesidades del mercado.
- 20 Existen varios procedimientos de separación del trigo utilizados por la industria y descritos en la bibliografía. Estos procedimientos industriales difieren, principalmente, en las formas de las mezclas de harina y agua presentadas al equipo de fraccionamiento (centrífugo, hidrociclón o tamiz) o en las condiciones de reacción iniciales como la temperatura y la aplicación de cizallamiento (Abdulvahit Sayaslan, Lebensm.-Wiss. U.-Technol 37 (2004) 499-515, Wetmilling of wheat flour: industrial processes and small-scale test methods).
- 25 En el método para separar una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) en fracciones de almidón y gluten, el método comprende mezclar una harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo), agua y una xilanasa modificada. La harina de cereal, agua y la xilanasa modificada pueden mezclarse simultáneamente o secuencialmente. Como se describe en la presente memoria, la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) y el agua pueden mezclarse antes del mezclado con la xilanasa modificada.
- 30 Generalmente, la harina de cereal (por ejemplo, harina de trigo) se mezcla en una masa o pasta, con 35 a 63% de sólidos secos, a temperaturas de ~20-45°C. Después, la mezcla se procesa de la siguiente manera:
- 1) se deja la mezcla durante un tiempo (~30 minutos) en reposo y, secuencialmente, se saca el almidón de la mezcla con el uso de un tamiz, centrífuga o hidrociclón para separar la leche de almidón del gluten, o
  - 2) se aplica cizallamiento a la mezcla, opcionalmente, se diluye la mezcla adicionalmente y, después, se separa la harina de trigo mediante un hidrociclón o una centrífuga con decantador de 2 o 3 fases.
- 35 El término "sólidos secos", como se emplea en la presente memoria, significa sólidos totales (disueltos y no disueltos) de una suspensión acuosa (en %) en base al peso seco.
- En una realización de la presente invención, el método o uso tal como se reivindica puede incluir las etapas de mezclar harina de trigo para formar una masa o pasta con un contenido de 35 a 63% de sólidos secos, a una temperatura de aproximadamente 20 a aproximadamente 45°C y separar el almidón del gluten.
- 40 El método de la presente invención puede comprender, adicionalmente:
- a) dejar la mezcla durante aproximadamente 30 minutos en reposo y, secuencialmente, sacar el almidón de la mezcla con un tamiz, una centrífuga o un hidrociclón para separar la leche de almidón del gluten; o
  - b) aplicar cizallamiento a la mezcla y, opcionalmente, diluir la mezcla adicionalmente, separar el almidón del gluten con un hidrociclón o una centrífuga con decantador de 2 o 3 fases.
- 45 En la presente memoria se describe un método para mejorar la separación del almidón y el gluten por medio de la adición de una enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención convenientemente durante la etapa de mezclado inicial de la harina y el agua en los diversos procedimientos descritos anteriormente utilizados para la separación del almidón de trigo. La separación mejora por la adición de una xilanasa modificada durante la etapa de mezclado inicial debido a la reducción de la viscosidad y la hidrólisis de AXinsol y/o AXsol con la interferencia con las partículas de gluten. La degradación de estos poli- y oligosacáridos permite mejorar la aglomeración del gluten y, en consecuencia, mejorar la producción 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*).
- 50

Una ventaja del método descrito en la presente memoria es que genera producciones más altas de almidón A y/o un gluten de mejor calidad (por ejemplo, gluten vital de mejor calidad).

Una ventaja del método descrito en la presente memoria es que mejora la separación del almidón del gluten de trigo.

5 Una de las formas para evaluar la calidad del gluten es el control de la aglomeración del gluten. Cuando se aplica una cierta cantidad de fricción a través del amasado de la masa o mezclado de la pasta, las partículas de gluten tienden a aglomerarse en partículas más grandes que forman una red polimérica, llamada "gluten vital". El "gluten vital" puede añadirse a los productos alimenticios para mejorar las propiedades de los productos horneados tales como la resistencia de la masa, la vida útil y el volumen del pan (L. Day, M.A. Augustin, I.L. Batey and C.W. Wrigley; Wheat-gluten uses and industry needs; Trends in Food Science & Technology 17 (2006) 82-90).

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

20 La calidad del gluten se determina mediante la evaluación de la aglomeración del gluten. Esto se realiza por medio de centrifugado de la bola de gluten en una centrifuga especial que contiene un tamiz pequeño. Se pesan las partículas de gluten que atraviesan este tamiz (gluten pequeño) y se determina la cantidad total de gluten. El índice de gluten se calcula por medio de (total de gluten húmedo - gluten húmedo pequeño)/total de gluten húmedo. Cuanto mayor es la mejora de la aglomeración del gluten, más pequeña será la fracción de gluten pequeño y mayor el índice de gluten. Un índice de gluten alto, con un valor máximo teórico de 100%, indica una bola de gluten de calidad alta.

25 Otro valor para cuantificar la cantidad de gluten es la producción de gluten seco (%). Este valor se calcula por medio de la división de los gramos de gluten seco total por la cantidad total de harina seca que se utilizó en el experimento. Cuanto más gluten secado se recupera, mejor es la separación. Este ensayo industrial se encuentra actualmente en adaptación para simular el procedimiento de separación de masa utilizado en la industria.

#### Dosificaciones

30 Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) en el intervalo de aproximadamente 500 UX/kg a aproximadamente 16.000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), más preferiblemente, de aproximadamente 750 UX/kg de pienso a aproximadamente 8000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), preferiblemente, de aproximadamente 1500 UX/kg de pienso a aproximadamente 3000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), preferiblemente, de aproximadamente 2000 UX/kg de pienso a

35 aproximadamente 2500 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 1000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso) a aproximadamente 4000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

40 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) a más de aproximadamente 500 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, más de aproximadamente 600 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, más de aproximadamente 700 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, más de aproximadamente 800 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, más de aproximadamente 900 UX/kg de material que

45 contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, más de aproximadamente 1000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, más de aproximadamente 2000 UX/kg, convenientemente, más de aproximadamente 2500 UX/kg, convenientemente, más de aproximadamente 3000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

50 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) a una concentración de aproximadamente 2000 UX/kg a aproximadamente 2500 UX/kg.

55 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasas, por ejemplo, la enzima xilanasas GH10 (tal como la enzima xilanasas GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en el material que contiene xilano (por ejemplo, alimento para animales) en una cantidad menor que aproximadamente 16.000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, menor que aproximadamente 8000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, menor que aproximadamente 7000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, menor que aproximadamente 6000 UX/kg

de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, menor que aproximadamente 5000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso), convenientemente, menor que aproximadamente 4000 UX/kg de material que contiene xilano (por ejemplo, pienso).

5 Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede estar presente en una composición de aditivo para pienso en el intervalo de aproximadamente 100 UX/kg a aproximadamente 320.000 UX/kg de la composición, más preferiblemente, de aproximadamente 300 UX/kg de la composición a aproximadamente 160.000 UX/kg de la composición y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 500 UX/kg de la composición a aproximadamente 50.000 UX/kg de la composición y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 500 UX/kg de la composición a aproximadamente 40.000 UX/kg de la composición.

10 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención está presente en la composición de aditivo para pienso en más de aproximadamente 100 UX/kg de la composición, convenientemente, más de aproximadamente 200 UX/kg de la composición, convenientemente, más de aproximadamente 300 UX/kg de la composición, convenientemente, más de aproximadamente 400 UX/kg de la composición, convenientemente, más de aproximadamente 500 UX/kg de la composición.

15 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención está presente en la composición de aditivo para pienso en una cantidad menor que aproximadamente 320000 UX/kg de la composición, convenientemente, menor que aproximadamente 160.000 UX/kg de la composición, convenientemente, menor que aproximadamente 50.000 UX/kg de la composición, convenientemente, menor que aproximadamente 40.000 UX/kg de la composición, convenientemente, menor que aproximadamente 30.000 UX/kg de la composición.

20 La actividad xilanasa puede expresarse en unidades de xilanasa (UX) determinada a un pH de 5,0 con AZCL-arabinoxilano (arabinoxilano de trigo entrecruzado con azurina, por ejemplo, comprimido Xylazyme, Megazyme) como sustrato. La hidrólisis por la *endo*-(1-4)- $\beta$ -D-xilanasa (xilanasa) produce fragmentos coloreados solubles en agua, y la velocidad de liberación de estos (aumento en la absorbancia a 590 nm) puede relacionarse directamente con la actividad enzimática. Las unidades de xilanasa (UX) se determinan con relación a un patrón enzimático (xilanasa Danisco, disponible de Danisco Animal Nutrition) en condiciones de reacción convencionales, que son 40°C, 5 min de tiempo de reacción en un tampón de McIlvaine, pH 5,0.

25 La actividad xilanasa de la enzima patrón se determina como la cantidad de grupos terminales de azúcares reductores liberados por minuto desde un sustrato de avena-espelta-xilano a un pH de 5,3 y 50°C. Los grupos terminales de azúcares reductores reaccionan con ácido 3,5-dinitrosalicílico, y la formación del producto de reacción puede medirse como el aumento en la absorbancia a 540 nm. La actividad enzimática se cuantifica con relación a una curva patrón de xilosa (equivalentes de azúcares reductores). Una unidad de xilanasa (UX) es la cantidad de enzima patrón que libera 0,5  $\mu$ moles de equivalentes de azúcares reductores por minuto a un pH de 5,3 y 50°C.

30 En una realización, convenientemente, la enzima se clasifica con la clasificación E.C. anterior, y la clasificación E.C. designa una enzima que tiene esa actividad cuando se prueba en el ensayo que se ilustra en la presente memoria para determinar 1 UX.

35 Preferiblemente, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se encuentra presente en la etapa de mezclado de un procedimiento de separación de almidón de trigo en la masa o pasta en el intervalo de aproximadamente 0,01 kg/TM de DS de masa o pasta a aproximadamente 0,60 kg/TM de DS, más preferiblemente, de aproximadamente 0,05 kg/TM de DS a aproximadamente 0,45 kg/TM de DS de masa o pasta y, aún más preferiblemente, de aproximadamente 0,10 kg/TM de DS a aproximadamente 0,25 kg/TM de DS de masa o pasta.

40 Como se describe en la presente memoria (particularmente, en la realización de separación del almidón de trigo) la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,019 g/proteína/TM de DS de harina de trigo (que equivale a 0,019 mg/kg de DS) a aproximadamente 119 g de proteína/TM de DS de harina de trigo (que equivale a 119 mg/kg de DS - en donde DS significa contenido de sólidos secos y TM significa tonelada métrica).

45 Como se describe en la presente memoria (particularmente, en la realización de separación del almidón de trigo) la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse a aproximadamente 1,19 g de proteína/TM de DS de harina de trigo (que equivale a aproximadamente 1,19 mg/kg de DS) - en donde DS significa contenido de sólidos secos y TM significa tonelada métrica.

50 Como se describe en la presente memoria (particularmente, en la realización de separación del almidón de trigo) la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse en el intervalo de

aproximadamente 9 a aproximadamente 120.000 unidades/kg de harina de trigo, convenientemente, de aproximadamente 500 a 2400 unidades/kg de harina de trigo, convenientemente, de aproximadamente 900 a 1200 unidades/kg de harina de trigo (en donde 1 unidad se define como la cantidad de enzima que se requiere para producir 1 micromol de equivalentes de azúcares reductores de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 4).

Como se describe en la presente memoria (particularmente, en la degradación del material a base de grano) la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,29 g/proteína/TM de DS de trigo (que equivale a 0,29 mg/kg de DS) a aproximadamente 0290 g/proteína/DS de trigo (que equivale a 290 mg/kg de DS).

Como se describe en la presente memoria (particularmente, en la degradación de material a base de grano) la xilanasa puede dosificarse a 2,9 g/proteína/TM de DS de trigo (que equivale a 2,9 mg/kg de DS). Como se describe en la presente memoria (particularmente, en la degradación del material a base de grano) la xilanasa puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 22 a aproximadamente 285.000 unidades/kg, convenientemente, de aproximadamente 1100 a aproximadamente 5700 unidades/kg, convenientemente, de aproximadamente 2200 a aproximadamente 2850 unidades/kg (en donde 1 unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 micromol de equivalentes de azúcar reductor de xilosa por minuto en las condiciones del ensayo de madera de abedul del Ejemplo 4).

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición que comprende la enzima como se describe en la presente memoria puede diseñarse para dosificación de una sola vez o puede diseñarse para utilizarse (por ejemplo, alimentación) diariamente.

La cantidad óptima de la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición que comprende la enzima que se va a utilizar en la presente invención dependerá del producto que se vaya a tratar y/o del método de poner en contacto el producto con la composición y/o del uso previsto para la misma.

La cantidad de enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención utilizada en las composiciones debe ser una cantidad suficiente para ser eficaz.

La cantidad de enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención utilizada en las composiciones debe ser una cantidad suficiente para ser eficaz y mantener su eficacia, por ejemplo, para mejorar el rendimiento de un producto para piensos para alimentar animales que contiene dicha composición. Este tiempo para la eficacia debe extenderse hasta al menos el momento de uso del producto (por ejemplo, la composición de aditivo para pienso o el pienso que la contiene).

#### Formulación

En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede formularse como un líquido, un polvo seco o un gránulo.

El polvo seco o los gránulos pueden prepararse por medios conocidos por los expertos en la técnica, tales como un recubridor de lecho fluidificado por rociado superior, rociado de fondo Wurster o mediante granulación en tambor (por ejemplo, granulación de alto cizallamiento), extrusión, recubrimiento en bandeja o en un mezclador de microingredientes.

Para algunas realizaciones, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede estar recubierta, por ejemplo, encapsulada.

En una realización, el recubrimiento protege la enzima modificada del calor y puede considerarse un protector térmico.

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

En una realización, la composición de aditivo para pienso de la presente invención puede formularse en un gránulo para composiciones de pienso que comprenden un núcleo; un agente activo; y al menos un recubrimiento; conservando el agente activo del gránulo al menos 50% de la actividad, al menos 60% de la actividad, al menos 70% de la actividad, al menos 80% de la actividad después de las condiciones seleccionadas de una o más de a) un procedimiento de peletización del pienso, b) un procedimiento de pretratamiento del pienso calentado por vapor de

agua, c) almacenamiento, d) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla no peletizada, y e) almacenamiento como un ingrediente en una mezcla de base de pienso o una premezcla de pienso que comprende al menos un compuesto seleccionado entre minerales traza, ácidos orgánicos, azúcares reductores, vitaminas, cloruro de colina y compuestos que dan como resultado una mezcla de base de pienso o premezcla de pienso acidas o alcalinas.

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

El gránulo puede producirse con un procedimiento de peletización del pienso y el procedimiento de pretratamiento del pienso puede realizarse a una temperatura de 70°C a 95°C durante varios minutos, tal como de 85°C a 95°C.

- 15 En una realización, la composición de aditivo para pienso de la presente invención puede formularse hasta un gránulo para pienso para animales que comprende un núcleo; un agente activo; conservando el agente activo del gránulo al menos 80% de la actividad después del almacenamiento y después de un procedimiento de peletización calentado por vapor de agua en donde el gránulo es un ingrediente; un recubrimiento de barrera de humedad; y un recubrimiento hidratante para humedecer que constituye al menos 25% p/p del gránulo; teniendo el gránulo una actividad en agua menor que 0,5 antes del procedimiento de peletización calentado con vapor de agua.

- 20 El gránulo puede tener un recubrimiento de barrera de humedad seleccionado entre polímeros y gomas y el material hidratante para humedecer puede ser una sal inorgánica. El recubrimiento hidratante para humedecer puede constituir de 25% a 45% p/p del gránulo y el recubrimiento de barrera de humedad puede constituir de 2% a 10% p/p del gránulo.

El gránulo puede producirse con el uso de un procedimiento de peletización calentado por vapor de agua que puede realizarse a una temperatura de 85°C a 95°C durante varios minutos.

- 25 En algunas realizaciones, la enzima de la presente invención puede diluirse con el uso de un diluyente, tal como polvo de almidón o caliza.

- 30 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima de la presente invención está en una formulación líquida adecuada para el consumo, preferiblemente, tal consumo líquido contiene uno o más de los siguientes: un tampón, sal, sorbitol y/o glicerol.

En otra realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima puede formularse mediante la aplicación, por ejemplo, rociado, de la enzima o enzimas sobre un sustrato portador, tal como trigo triturado, por ejemplo.

- 35 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima de acuerdo con la presente invención puede formularse como una premezcla. Por ejemplo, solamente la premezcla puede comprender uno o más componentes para piensos, tal como uno o más minerales y/o una o más vitaminas.

- 40 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, para su uso en la presente invención se formula con al menos un portador fisiológicamente aceptable seleccionado entre al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato de calcio), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbato, glicerol, sacarosa, propilenglicol, 1,3-propanodiol, glucosa, parabenos, cloruro de sodio, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.

#### Envasado

- 50 En una realización se envasa la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención y/o composición que la comprende (por ejemplo, composición de aditivo para pienso) y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales como se describe en la presente memoria.

En una realización preferida, la composición de aditivo para pienso y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales de la presente invención se envasa en una bolsa, tal como una bolsa de papel.

En una realización alternativa, la composición de aditivo para pienso y/o premezcla y/o pienso o alimento para animales de la presente invención puede estar sellada en un recipiente. Se puede utilizar cualquier recipiente adecuado.

## Formas

5 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que comprende la enzima (por ejemplo, la composición de aditivo para pienso) de la presente invención y otros componentes y/o el alimento para animales que la comprende se pueden utilizar de cualquier forma adecuada.

10 La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o composición que la comprende (por ejemplo, la composición de aditivo para pienso) de la presente invención se puede utilizar en forma de preparaciones sólidas o líquidas o alternativas de estas. Los ejemplos de preparaciones sólidas incluyen polvos, pastas, bolo ruminal, cápsulas, pélets, comprimidos, píldoras, cápsulas, óvulos, soluciones o suspensiones, espolvoreables, y gránulos que pueden ser humectables, secados por aspersion o liofilizados. Los ejemplos de preparaciones líquidas incluyen, pero no se limitan a, soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas, orgánicas o acuosas-orgánicas.

15 La composición que comprende la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención puede contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada, modificada, continua, pulsada o controlada.

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

25 Los ejemplos de portadores aceptables nutricionalmente para su uso en la preparación de las formas incluyen, por ejemplo, agua, soluciones salinas, alcohol, silicona, ceras, gelatina de petróleo, aceites vegetales, polietilenglicoles, propilenglicol, liposomas, azúcares, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, tensioactivos, ácido silícico, parafina viscosa, aceite esencial, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres petroethral de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

30 Los excipientes preferidos para las formas incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular.

Para suspensiones y/o elixires acuosos, la composición de la presente invención puede combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, colorantes o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

## Sujeto

35 El término "sujeto", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un animal al que se administró o se va a administrar una xilanasa modificada de acuerdo con la presente invención o una composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención o un alimento para animales que comprende esa composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención.

El término "sujeto", como se emplea en la presente memoria, se refiere a un animal.

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

En una realización, el "sujeto" es un animal de ganadería.

45 El término "ganado", como se emplea en la presente memoria, se refiere a cualquier animal de criadero. Preferiblemente, el ganado es uno o más rumiantes tal como ganado vacuno (por ejemplo, vacas o toros (que incluyen terneros)), animales monogástricos, tales como aves de corral (que incluyen pollos de engorde, gallinas y pavos), cerdos (que incluyen lechones), aves, animales acuáticos tales como peces, peces no gástricos, peces gástricos, peces de agua dulce, tales como salmón, bacalao, trucha y carpa, por ejemplo, carpa Koi, peces de mar, tales como róbalo y crustáceos tales como camarones, mejillones y vieiras), caballos (que incluyen caballos de carrera), ganado ovino (que incluye corderos).

50 En otra realización, el "sujeto" es un animal domesticado o mascota o un animal mantenido en un zoológico.

Los términos "animal domesticado" o "mascota" o "animal mantenido en un zoológico", como se utilizan en la presente memoria, se refieren a cualquier animal relevante que incluye cánidos (por ejemplo, perros), félicos (por ejemplo, gatos), roedores (por ejemplo, conejillos de indias, ratas, ratones), aves, peces (que incluyen peces de agua dulce y de mar) y caballos.

## Rendimiento

5 Como se emplea en la presente memoria, el “rendimiento del animal” puede determinarse por la eficacia del pienso y/o el aumento de peso del animal y/o por el índice de conversión del pienso y/o por la digestibilidad de un nutriente en un pienso (por ejemplo, digestibilidad del aminoácido) y/o energía digestible o energía metabolizable en un pienso y/o por 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 inmunitaria del sujeto.

Preferiblemente, el “rendimiento del animal” se determina por la eficacia del pienso y/o ganancia de peso del animal y/o por el índice de conversión de pienso.

10 Por “mayor rendimiento del animal” se entiende que hay una mayor eficacia del pienso y/o mayor aumento de peso y/o un menor índice de conversión del pienso y/o mejor digestibilidad de nutrientes o energía en un pienso y/o por una mejor retención de nitrógeno y/o por una mejor respuesta inmunitaria en el sujeto que resulta del uso de una composición de aditivo para pienso de la presente invención en el pienso en comparación con el pienso que no comprende esa composición de aditivo para pienso.

15 Preferiblemente, por “mayor rendimiento del animal” se entiende que hay una mayor eficacia del pienso y/o mayor aumento de peso y/o menor índice de conversión del pienso.

Como se emplea en la presente memoria, el término “eficacia del pienso” se refiere a la cantidad del aumento de peso por unidad de pienso cuando se alimenta al animal ad-libitum o con una cantidad especificada de pienso durante un período de tiempo.

20 Por “mayor eficacia del pienso” se quiere significar que el uso de una composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención en el pienso produce un mayor aumento de peso por unidad de consumo de pienso en comparación con un animal alimentado sin que esa composición de aditivo para pienso esté presente.

## Índice de conversión de pienso (ICP)

Como se emplea en la presente memoria, el término “índice de conversión de pienso” se refiere a la cantidad de pienso con que se alimenta a un animal para aumentar el peso del animal en un nivel específico.

25 Un índice de conversión de pienso mejorado significa un menor índice de conversión de pienso.

30 “Menor índice de conversión de pienso” o “índice de conversión de pienso mejorado” significan que el uso de una composición de aditivo para pienso en el pienso reduce la cantidad de pienso que se debe suministrar a un animal para aumentar el peso del animal en una cantidad especificada en comparación con la cantidad de pienso necesaria para aumentar el peso del animal en la misma cantidad cuando el pienso no comprende esa composición de aditivo para pienso.

## Digestibilidad de los nutrientes

35 Como se emplea en la presente memoria, “digestibilidad del nutriente” se refiere a la fracción de un nutriente que desaparece del tracto gastrointestinal o de un segmento específico del tracto gastrointestinal, por ejemplo, el intestino delgado. La digestibilidad del nutriente se puede medir como la diferencia entre la cantidad administrada al sujeto y la cantidad excretada en las heces del sujeto o entre la cantidad administrada al sujeto y la cantidad que permanece en la digesta en un segmento específico del tracto gastrointestinal, por ejemplo, el íleo.

40 Como se emplea en la presente memoria, la digestibilidad del nutriente se puede medir por la diferencia entre la ingesta de un nutriente y el nutriente excretado por medio de la recolección total del excremento durante un periodo de tiempo; o con el uso de un marcador inerte que no se absorbe en el cuerpo del animal y permite que el investigador calcule la cantidad de nutriente que desapareció en todo el tracto gastrointestinal o en un segmento del tracto gastrointestinal. Tal marcador inerte puede ser dióxido de titanio, óxido crómico o ceniza insoluble en ácido. La digestibilidad se puede expresar como un porcentaje del nutriente en el pienso o como unidades de masa de nutriente digestible por unidades de masa de nutriente en el pienso.

45 Como se emplea en la presente memoria, la digestibilidad del nutriente abarca la digestibilidad del almidón, la digestibilidad de la grasa, la digestibilidad de la proteína y la digestibilidad de los aminoácidos.

50 Como se emplea en la presente memoria, la digestibilidad de la energía se refiere a la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta de las heces o la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta de la digesta restante en un segmento específico del tracto gastrointestinal del animal, por ejemplo, el íleo. Como se emplea en la presente memoria, la energía metabolizable se refiere a la energía metabolizable aparente y significa la energía bruta del pienso consumido menos la energía bruta contenida en las heces, orina y productos gaseosos de la digestión. La digestibilidad de la energía y la energía metabolizable pueden medirse como la diferencia entre el consumo de energía bruta y la energía bruta excretada en las heces o la digesta presente en un segmento específico del tracto gastrointestinal con el uso de los mismos métodos aplicados para medir la digestibilidad de nutrientes con las correcciones apropiadas para la excreción de nitrógeno con el fin de calcular la energía metabolizable del pienso.

## Combinación con otros componentes

La enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se puede utilizar combinada con otros componentes.

- 5 En una realización, la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención se puede utilizar combinada con un probiótico o un microbio alimentado directamente (DFM), por ejemplo, una bacteria alimentada directamente.

- 10 La combinación descrita en la presente memoria comprende la enzima que tiene actividad xilanasa, por ejemplo, la enzima xilanasa GH10 (tal como la enzima xilanasa GH10 modificada) o un fragmento de la misma, de la presente invención o una composición que comprende la xilanasa, por ejemplo, una composición de aditivo para pienso, y otro componente que es adecuado para el consumo humano o animal y es capaz de proporcionar un beneficio médico o fisiológico al consumidor.

En una realización, el “otro componente” puede ser una o más enzimas adicionales (por ejemplo, otras enzimas de pienso o enzimas de la elaboración de cerveza o malta, o enzimas del procesamiento de granos o enzimas de separación del almidón-gluten de trigo).

- 15 Otras enzimas adecuadas para su uso en la presente invención pueden ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en: endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4); celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91),  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), celulasas (E.C. 3.2.1.74), liquenasas (E.C. 3.1.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), acetiltransferasas lipídicas (clasificadas, generalmente, como E.C. 2.3.1.x), fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), fitasas (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. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73), 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, estererasas y/o mananasas (por ejemplo, una  $\beta$ -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).
- 20

- 25 En una realización (particularmente, para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una o más de las enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una amilasa (que incluye  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y  $\alpha$ -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. 3.1.38)).

- 30 En una realización (particularmente, para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una combinación de una amilasa (por ejemplo,  $\alpha$ -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  $\beta$ -glucanasa, por ejemplo, una endo-1,3(4)-3-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. 3.1.38)).

- 35 En una realización (particularmente, para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una mananasa (por ejemplo, una  $\beta$ -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).

En una realización (particularmente, para aplicaciones de pienso) el otro componente puede ser una lipasa (E.C. 3.1.1.3), una aciltransferasa lipídica (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), convenientemente, una lipasa (E.C. 3.1.1.3).

- 40 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)).

En una realización, el componente adicional puede ser un estabilizante o un emulsionante o un aglutinante o un portador o un excipiente o un diluyente o un disgregante.

- 45 El término “estabilizante”, como se emplea en la presente memoria, se define como un ingrediente o combinación de ingredientes que evita que un producto (por ejemplo, un producto de pienso) cambie en el tiempo.

- 50 El término “emulsionante”, como se emplea en la presente memoria, se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de un pienso) que evita la separación de las emulsiones. Las emulsiones son dos sustancias inmiscibles, una presente en forma de gotitas contenida dentro de la otra. Las emulsiones pueden consistir en aceite en agua, en donde la fase de gotitas o la fase dispersa es aceite y la fase continua es agua; o agua en aceite en donde el agua se vuelve la fase dispersa y la fase continua es aceite. Las espumas, que son gas en líquido y las suspensiones que son sólido en líquido pueden, además, estabilizarse a través del uso de emulsionantes.

- 5 Como se emplea en la presente memoria, el término “aglutinante” se refiere a un ingrediente (por ejemplo, un ingrediente de pienso) que aglutina el producto a través de una reacción física o química. Durante la “gelificación” por ejemplo, el agua se absorbe, y proporciona un efecto aglutinante. Sin embargo, los aglutinantes pueden absorber otros líquidos, tales como aceites, y contenerlos dentro del producto. En el contexto de la presente invención los aglutinantes se utilizarán, típicamente, en productos sólidos o de bajo contenido de humedad, por ejemplo, productos de horneado, pasteles, rosquillas, pan y otros. Los ejemplos de aglutinantes de granulación incluyen uno o más de polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, maltosa, gelatina y acacia.
- 10 “Portadores” se refiere a materiales adecuados para la administración de la enzima e incluye cualquier material conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, cualquier líquido, gel, disolvente, diluyente líquido, solubilizante, que no es tóxico y que no interactúa con ningún componente de la composición de manera perjudicial.
- 15 En la presente memoria se describe un método para preparar una composición (por ejemplo, una composición de aditivo para pienso) que comprende mezclar una enzima de la presente invención con al menos un portador fisiológicamente aceptable seleccionado entre al menos uno de maltodextrina, caliza (carbonato de calcio), ciclodextrina, trigo o un componente de trigo, sacarosa, almidón,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , talco, PVA, sorbitol, benzoato, sorbato, glicerol, sacarosa, propilenglicol, 1,3-propanodiol, glucosa, parabenos, cloruro de sodio, citrato, acetato, fosfato, calcio, metabisulfito, formiato y mezclas de los mismos.
- 20 Los ejemplos de “excipientes” incluyen uno o más de celulosa microcristalina y otras celulosas, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico, glicina, almidón, azúcar de leche y polietilenglicoles de alto peso molecular.
- Los ejemplos de “disgregantes” incluyen uno o más de: almidón (preferiblemente, almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa sódica y ciertos silicatos complejos.
- Los ejemplos de “diluyentes” incluyen uno o más de: agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- 25 Los otros componentes se pueden utilizar simultáneamente (por ejemplo, cuando están juntos en una mezcla o aun cuando se suministran por distintas rutas) o secuencialmente (por ejemplo, pueden suministrarse por distintas rutas) a la xilanasas de la presente invención.
- Preferiblemente, cuando la composición de aditivo para pienso de la presente invención se mezcla junto con otro u otros componentes, el DFM sigue siendo viable.
- 30 En una realización, preferiblemente, la composición de aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención no comprende cromo o cromo orgánico
- En una realización, preferiblemente, el aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención no contiene glucanasa.
- 35 En una realización, preferiblemente, el aditivo para pienso de acuerdo con la presente invención no contiene ácido sórbico.
- Aislada
- 40 En un aspecto, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico o enzima de acuerdo con la presente invención, están en una forma aislada. El término “aislada” significa que la secuencia o la enzima o el ácido nucleico están al menos sustancialmente libres de al menos otro componente con el que la secuencia, la enzima o el ácido nucleico se asocia naturalmente en la naturaleza y tal como se encuentra de naturaleza. La secuencia, la enzima o el ácido nucleico de la presente invención pueden proporcionarse en una forma que está sustancialmente libre de uno o más contaminantes con los cuales la sustancia podría asociarse de cualquier otra manera. Por lo tanto, por ejemplo, puede estar sustancialmente libre de uno o más polipéptidos y/o moléculas de ácido nucleico potencialmente contaminantes.
- 45 Purificada
- 50 En un aspecto, preferiblemente, la secuencia, la enzima o el ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está en una forma purificada. El término “purificada” significa que el componente dado está presente a un alto nivel. El componente es, convenientemente, el componente predominante presente en una composición. Preferiblemente, está presente a un nivel de al menos aproximadamente 90% o al menos aproximadamente 95% o al menos aproximadamente 98%; estando determinado dicho nivel sobre una base de peso seco/peso seco con respecto a la composición total que se considera.

## Secuencia de nucleótidos

Se describen en la presente memoria secuencias de nucleótidos que codifican proteínas que tienen las propiedades específicas tal como se definen en la presente memoria.

5 El término "secuencia de nucleótidos", como se emplea en la presente memoria, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tales como porciones de las mismas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, puede ser bicatenaria o monocatenaria ya sea que represente la cadena efectora o la cadena antisentido.

10 El término "secuencia de nucleótidos" en relación a la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferiblemente, significa ADN, más preferiblemente, secuencia codificante del ADNc para la presente invención.

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

15 En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos relacionada con el alcance propio de la invención y abarcada por dicho alcance no incluye la secuencia de nucleótidos nativa de acuerdo con la presente invención cuando está en su ambiente natural y cuando está vinculada con su o sus secuencias asociadas naturalmente que está o están también en su entorno natural. Para hacer más fácil la referencia, los autores de la presente invención llamarán a esta realización preferida "secuencia de nucleótidos no nativa". En este sentido, el término "secuencia de nucleótidos nativa" se refiere a una secuencia total de nucleótidos en su ambiente nativo y, cuando se conecta operativamente a un promotor completo con el que se relaciona naturalmente, el promotor se encuentra, además, en su entorno nativo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos comprendida en el alcance de la presente invención puede aislarse y/o purificarse después de la expresión de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo. Sin embargo, preferiblemente, la secuencia de aminoácidos comprendida en el alcance de la presente invención puede expresarse por medio de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo, pero en donde la secuencia de nucleótidos no está controlada por el promotor con el cual se asocia naturalmente dentro de ese organismo.

25 Típicamente, la secuencia de nucleótidos comprendida en el alcance de la presente invención se prepara con el uso de técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos podría sintetizarse, completa o parcialmente, con el uso de métodos químicos muy conocidos en la técnica (véase Caruthers MH *et al.*, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T *et al.*, (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

## Preparación de la secuencia de nucleótidos

30 Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que tiene las propiedades específicas, tal como se define en la presente memoria, o una proteína que es adecuada para su modificación puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse a partir de cualquier célula u organismo que produce esa proteína. En la técnica se conocen varios métodos para identificar y/o aislar y/o purificar secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia una vez que se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

40 Como otro ejemplo, puede construirse un ADN genómico y/o genoteca de ADNc con el uso de ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la enzima. Si se conoce la secuencia de aminoácidos de la enzima, puede sintetizarse y utilizarse sondas de oligonucleótidos marcadas para identificar los clones que codifican enzimas de la genoteca genómica preparada a partir del organismo. Alternativamente, se podría utilizar una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen de enzima conocido para identificar clones que codifican enzimas. En el último caso, se utilizan condiciones de hibridación y lavado de menor rigurosidad.

45 Alternativamente, los clones que codifican enzimas se podrían identificar mediante la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de bacterias sin enzimas con la genoteca de ADN genómica resultante y, después, la siembra de la bacteria transformada sobre placas con agar que contienen un sustrato para enzimas (es decir, arabinosilano), de manera que se puedan identificar los clones que expresan la enzima.

50 En otra alternativa adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse, sintéticamente, con métodos convencionales establecidos, por ejemplo, el método de la 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. En el método de la fosforoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, reasocian, ligan y clonan en vectores adecuados.

55 La secuencia de nucleótidos puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc o de origen mixto genómico y de ADNc, que se prepara al ligar fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según convenga) de acuerdo con técnicas convencionales. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia completa de nucleótidos. La secuencia de ADN puede prepararse, además, por reacción en cadena de la

polimerasa (PCR) con el uso de cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. Núm. 4.683.202 o en Saiki R K et al., (*Science* (1988) 239, pág. 487-491).

#### Secuencias de aminoácidos

5 Se describen en la presente memoria secuencias de aminoácidos de enzimas que tienen las propiedades específicas tal como se definen en la presente memoria.

Como se emplea 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".

10 La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse de una fuente adecuada o puede elaborarse sintéticamente o puede prepararse con el uso de técnicas de ADN recombinante.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos relacionada con el alcance propio de la invención y comprendida en ese alcance no es una enzima nativa. En este sentido, el término "enzima nativa" se refiere a una enzima completa que se encuentra en su ambiente nativo, expresada por su secuencia de nucleótidos nativa.

#### Identidad de secuencias u homología de secuencias

15 También se describe en la presente memoria el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la o las secuencias de aminoácidos de un polipéptido cuyas propiedades específicas están definidas en la presente memoria o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido (mencionadas de aquí en adelante como una o varias "secuencias homólogas"). En la presente memoria, el término "homóloga" se refiere a una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácidos sujeto y las  
20 secuencias de nucleótidos sujeto. En la presente memoria, el término "homología" puede equivaler a "identidad".

Las secuencias de aminoácidos y/o secuencias de nucleótidos homólogas deben proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o mejora la actividad de la enzima.

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

Como se describe en la presente memoria, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 85% idéntica, preferiblemente, al menos 90 o 95% idéntica a la secuencia sujeto.

30 Por ejemplo, típicamente, las secuencias homólogas comprenden los mismos sitios activos, etc. que la secuencia de aminoácidos sujeto. Aunque la homología puede considerarse, además, en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

35 Como se describe en la presente memoria, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que tiene una o varias adiciones, deleciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia sujeto.

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

40 Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de polipéptidos se determina mediante el uso de SEQ ID No. 1 como secuencia sujeto en un alineamiento de secuencias. Como se describe en la presente memoria, la secuencia de polipéptidos sujeto se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5.

45 Preferiblemente, el % de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina mediante el uso de SEQ ID No. 2 como secuencia sujeto en el alineamiento de secuencias. Como se describe en la presente memoria, la secuencia sujeto para las secuencias de nucleótidos se puede seleccionar del grupo que consiste en SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.

Un "ácido nucleico parental" o "aminoácido parental" significan una secuencia de ácidos nucleicos o una secuencia de aminoácidos, codificante o que codifica para el polipéptido parental, respectivamente.

50 En la presente memoria se describe una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en la presente memoria o una proteína derivada de esta proteína (parental) por sustitución, deleción o adición de uno o varios aminoácidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

De manera conveniente, 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.

En la presente memoria se describe una secuencia de ácido nucleico (o gen) que codifica una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en la presente memoria o que codifica una proteína derivada de esta proteína (parental) por sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tal como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

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

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

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

Las comparaciones de homología se pueden realizar a simple vista o, más usualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología o el % de identidad entre dos o más secuencias.

El % de homología o % de identidad pueden calcularse en secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia, y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo por vez. Esto se denomina alineamiento "sin huecos". Típicamente, tales alineamientos sin huecos se realizan únicamente en un número relativamente bajo de residuos.

Aunque este método es muy simple y consistente, falla al tomar en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas de cualquier otra manera, una inserción o una delección harán que los siguientes residuos de aminoácidos estén fuera de alineamiento, y esto dará como resultado, potencialmente, una gran reducción en el % de homología o % de identidad cuando se realiza un alineamiento global. Consecuentemente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta las posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología total. Esto se logra al insertar "huecos" en el alineamiento de secuencias para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por huecos" a cada hueco que se produce en el alineamiento de manera que, para la misma cantidad de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con la cantidad menor de huecos posible, que refleja una relación mayor entre las dos secuencias comparadas, alcanza una puntuación más alta que un alineamiento con muchos huecos. Típicamente, se utiliza "costes de huecos afines" que cargan un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos utilizado más comúnmente. Por supuesto, las penalizaciones por huecos altas producen alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores predeterminados cuando se utiliza un programa para comparaciones de secuencias.

Por lo tanto, el cálculo del % de homología o % de identidad máximo requiere, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo, que tiene en cuenta las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de programas útiles que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, el paquete BLAST (véase Ausubel et al. 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4.ª ed - capítulo 18), BLAST 2 (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA se encuentran disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, pág. 7-58 a 7-60), tal como, por ejemplo, en la herramienta de búsquedas GenomeQuest ([www.genomequest.com](http://www.genomequest.com)).

Aunque el % de homología o % de identidad final se pueden determinar en términos de identidad, el procedimiento de alineamiento en sí no está basado, típicamente, en una comparación de pares de todo o nada. En cambio, se usa, generalmente, una matriz graduada de puntuaciones de similitud que asigna puntuaciones a cada comparación de pares en función de la similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz que se utiliza comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz predeterminada para el paquete integrado de programas BLAST. Los programas Vector NTI utilizan, generalmente, los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos

personalizados, si se proporciona (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar los valores predeterminados para el paquete Vector NTI.

5 Alternativamente, el porcentaje de homología puede calcularse con el uso de la función de alineamientos múltiples en Vector NTI (Invitrogen Corp.), basada en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

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

10 Si se utilizan las penalizaciones por huecos al determinar la identidad de secuencias, entonces se utilizan, preferiblemente, los siguientes parámetros para el alineamiento de pares:

PARA BLAST	
APERTURA DEL HUECO	9
EXTENSIÓN DEL HUECO	2

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

En una realización, CLUSTAL se puede utilizar con la penalización por hueco y extensión del hueco, ajustadas como se definió anteriormente.

15 De manera conveniente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos o 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.

20 De manera conveniente, 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.

25 De manera conveniente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra en la presente memoria.

30 De manera conveniente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra en la presente memoria como la secuencia madura, por ejemplo, SEQ ID No. 2 o SEQ ID No. 24 o SEQ ID No. 25 o SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33. De manera conveniente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra en la presente memoria como SEQ ID No. 2.

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

35 De manera conveniente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteínas puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra en la presente memoria.

40 De manera conveniente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteínas puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra en la presente memoria como la secuencia madura, por ejemplo, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5. De manera conveniente, el grado de identidad con respecto a una secuencia de aminoácidos o proteínas puede determinarse sobre la secuencia completa que se ilustra en la presente invención como SEQ ID No. 1.

En el presente contexto, el término "secuencia de consulta" significa una secuencia homóloga o una secuencia foránea, que se alinea con una secuencia sujeto con el fin de ver si está dentro del alcance de la presente invención. Consecuentemente, dicha secuencia de consulta puede ser, por ejemplo, una secuencia de la técnica anterior o una tercera secuencia.

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

- 5 En una realización, el grado de identidad de secuencias entre una secuencia de consulta y una secuencia sujeto se determina 1) alineando las dos secuencias con cualquier programa de alineamiento adecuado mediante el uso de la matriz de puntuación predeterminada y la penalización por hueco predeterminada, 2) identificando la cantidad de coincidencias exactas, en donde una coincidencia exacta consiste en la identificación por el programa de alineamiento de un aminoácido o un nucleótido idénticos en las dos secuencias alineadas en una posición dada en el alineamiento, y 3) dividiendo el número de coincidencias exactas por la longitud de la secuencia sujeto.
- 10 En otra realización preferida más, el programa de alineamiento global se selecciona del grupo que consiste en CLUSTAL y BLAST (preferiblemente, BLAST), y la identidad de secuencia se calcula al identificar el número de coincidencias exactas identificadas por el programa dividido por la longitud de la secuencia sujeto.

Las secuencias pueden tener, además, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones intencionales de aminoácidos pueden realizarse en función de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, carácter hidrófilo y/o 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 principales polares no cargados que tienen valores similares de carácter hidrófilo incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparragina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

- 20 Las sustituciones conservativas pueden llevarse a cabo, por ejemplo, de acuerdo con la tabla de más abajo. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y, preferiblemente, en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

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

- 25 La descripción de la presente memoria abarca, además, la sustitución homóloga (“sustitución” y “reemplazo” se utilizan en la presente memoria para indicar el intercambio de un residuo de aminoácido existente con un residuo alternativo) que puede ocurrir, es decir, la sustitución de igual a igual, tal como alcalino por alcalino, ácido por ácido, polar por polar, etc. Además, puede ocurrir la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuo por otro o que implica, alternativamente, la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (de aquí en adelante mencionada como Z), ácido diaminobutírico ornitina (de aquí en adelante mencionada como B), norleucina ornitina (de aquí en adelante mencionada como O), pirlalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

- 30 Los reemplazos pueden realizarse, además, con aminoácidos no naturales que incluyen aminoácidos alfa\* y alfa-disustituídos\*, N-alkil aminoácidos\*, ácido láctico\*, derivados haluro de aminoácidos naturales, tales como trifluorotirosina\*, p-cl-fenilalanina\*, p-Br-fenilalanina\*, p-l-fenilalanina\*, L-alil-glicina\*, β-alanina\*, ácido L-α-aminobutírico\*, 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\*, 35 derivados metilo de fenilalanina (Phe), tales como 4-metil-Phe\*, pentametil-Phe\*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metilo)\*, L-Phe (4-isopropilo)\*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxilo)\*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)\*. La notación \* se ha utilizado para el propósito de la descripción anterior (en relación con la sustitución homóloga o no homóloga) para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado, en tanto que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado; #\* indica características anfipáticas.

- 40 Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualquier par de residuos de aminoácidos de la secuencia que incluye grupos alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de los espaciadores de aminoácidos, tales como residuos de glicina o de β-alanina. Los expertos en la técnica comprenderán bien una forma adicional de variación que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptóide. Para evitar dudas, “la forma peptóide” se utiliza para referirse a variantes 45 de residuos de aminoácidos, en donde el grupo sustituyente del carbono α se encuentra en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar de en el carbono α. Los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptóide 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.

Como se describe en la presente memoria, la xilanasas para su uso en la presente invención puede comprender una secuencia de polipéptidos que se muestra como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21 con una sustitución conservativa de al menos uno de los aminoácidos.

5 De manera conveniente, puede haber al menos 2 sustituciones conservativas, tales como al menos 3 o al menos 4 o al menos 5.

De manera conveniente, puede haber menos de 15 sustituciones conservativas, tales como menos de 12, menos de 10 o menos de 8 o menos de 5 sustituciones conservativas.

10 Las secuencias de nucleótidos para su uso en la presente invención pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos distintos de modificaciones de oligonucleótidos. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o 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 con cualquier método disponible en la técnica. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias de nucleótidos de la presente invención.

15 En la presente memoria se describe el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces esa secuencia se puede utilizar como sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

20 Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención, pero que se encuentran dentro del alcance de la presente invención, pueden obtenerse de distintas maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria pueden obtenerse, por ejemplo, por sondeo de genotecas de ADN que se elaboran a partir de una variedad de individuos, por ejemplo, individuos de distintas poblaciones. Adicionalmente, es posible obtener otros homólogos y, generalmente, tales homólogos y fragmentos de estos tendrán la capacidad de hibridarse selectivamente a las secuencias que se muestran en la lista de secuencias de la presente memoria. Tales secuencias pueden obtenerse por sondeo de las genotecas de ADNc elaboradas o genotecas de ADN de otras especies animales y sondeo de tales genotecas con sondas que comprenden toda o parte de cualquiera de las secuencias en las listas de secuencias adjuntas en condiciones de rigurosidad media a alta. Consideraciones similares se aplican para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias de polipéptidos o de nucleótidos de la invención.

25 Además, es posible obtener variantes y homólogos de cepa/especie con el uso de PCR con cebadores degenerados diseñados para dirigir las 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, al alinear las secuencias de aminoácidos de múltiples variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia pueden realizarse con el uso de programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es muy utilizado.

30 Los cebadores degenerados utilizados en la PCR contienen una o más posiciones degeneradas y se utilizan en condiciones de rigurosidad menor en comparación con las condiciones utilizadas para clonar secuencias con cebadores de secuencias individuales contra secuencias conocidas.

35 Alternativamente, tales polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios silenciosos de secuencias de codones para optimizar las preferencias codónicas para una célula anfitriona particular en la que se expresan las secuencias de polinucleótidos. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

40 Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención se pueden utilizar para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo, marcada con un marcador revelador por medios convencionales con el uso de marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tienen al menos 15, preferiblemente, al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud y están incluidos, además, en el término polinucleótidos de la presente invención, como se emplea en la presente memoria.

45 Los polinucleótidos, tales como los polinucleótidos y sondas de ADN de acuerdo con la invención, pueden producirse de manera recombinante, sintética o por cualquier método disponible para los experimentados en la técnica. Además, pueden clonarse mediante técnicas convencionales.

Generalmente, los cebadores se producen por medios sintéticos, que implican una elaboración gradual de la secuencia de ácido nucleico deseada, un nucleótido por vez. Los mecanismos para lograr esto mediante el uso de mecanismos automatizados están fácilmente disponibles en la técnica.

55 Generalmente, los polinucleótidos más largos se producen con el uso de medios recombinantes, por ejemplo, con el uso de técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para

contener sitios de restricción de reconocimiento de enzimas adecuados de manera que el ADN amplificado se pueda clonar en un vector de clonación adecuado.

#### Numeración de aminoácidos

5 En la presente invención, puede emplearse una numeración específica de posiciones de residuos de aminoácidos en las xilanasas utilizadas en la presente invención. Mediante el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las xilanasas de las muestras con la xilanasa de la presente invención (particularmente, SEQ ID No. 1), es posible asignar un número a una posición de residuos de aminoácido en la xilanasa de la muestra que corresponde a la posición de residuos de aminoácido o la numeración de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 1 de la presente invención.

#### 10 Hibridación

En la presente memoria se describen secuencias que son complementarias a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención o secuencias que tienen la capacidad de hibridarse ya sea a las secuencias de la presente invención o a secuencias complementarias a estas.

15 El término "hibridación", como se emplea en la presente memoria, incluirá "el procedimiento por el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria por medio de emparejamiento de bases", así como el procedimiento de amplificación como se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la presente memoria también se describe el uso de secuencias de nucleótidos que tienen la capacidad de hibridarse a las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente invención o cualquier fragmento o derivado de las mismas.

20 El término "variante" abarca, además, secuencias que son complementarias a secuencias que tienen la capacidad de hibridarse a las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50°C y 0,2xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato de Na<sub>3</sub> 0,015 M, pH de 7.0}) a las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

25 Con mayor preferencia, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones altamente rigurosas (por ejemplo, 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = NaCl 0,15 M, citrato de Na<sub>3</sub> 0,015 M, pH de 7.0}) a las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

30 En la presente memoria también se describen secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse a las secuencias de nucleótidos de la presente invención (que incluyen secuencias complementarias a las presentadas en la presente memoria).

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

Preferiblemente, la hibridación se analiza sobre la totalidad de las secuencias que se ilustran en la presente memoria.

#### 35 Expresión de enzimas

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

La expresión se puede controlar con el uso de secuencias de control, por ejemplo, secuencias reguladoras.

40 La proteína producida por una célula recombinante anfitriona por la expresión de la secuencia de nucleótidos se puede secretar o puede estar contenida intracelularmente, según la secuencia y/o vector que se use. Las secuencias codificantes se pueden diseñar con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificantes de la sustancia a través de una membrana celular procariótica o eucariótica determinada.

#### Vector de expresión

45 El término "vector de expresión" se refiere a una construcción con la capacidad de expresión *in vivo* o *in vitro*.

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

50 La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede estar presente en un vector en el cual la secuencia de nucleótidos se conecta operablemente a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por medio de un organismo anfitrión adecuado.

Los vectores útiles en la presente invención se pueden transformar en una célula anfitriona adecuada, tal como se describe más adelante, para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

La elección del vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido o un vector del fago dependerá, frecuentemente, de la célula anfitriona en la cual se va a introducir.

- 5 Los vectores útiles en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tal como un gen, que confiere resistencia a los antibióticos, por ejemplo, resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección se puede realizar por cotransformación (tal como se describe en el documento WO 91/17243).

- 10 Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula anfitriona.

Por lo tanto, en la presente memoria se describe adicionalmente un método para preparar secuencias de nucleótidos de la presente invención por medio de la introducción de una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector replicable, la introducción del vector en una célula anfitriona compatible y el crecimiento de la célula anfitriona en condiciones que dan lugar a la replicación del vector.

- 15 El vector puede comprender, adicionalmente, una secuencia de nucleótidos que permite al vector replicarse en la célula anfitriona en cuestión. Los ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y piJ702.

#### Secuencias reguladoras

- 20 En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos útil en la presente invención se conecta operablemente a una secuencia reguladora capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por medio de la célula anfitriona elegida. A modo de ejemplo, la presente invención abarca un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención conectada operablemente a esa secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

- 25 El término "conectada operablemente" se refiere a una yuxtaposición, en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su forma prevista. Una secuencia reguladora "conectada operablemente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias control.

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

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

- 30 La expresión mejorada de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención puede lograrse, asimismo, por la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, promotor, líder de secreción y regiones terminadoras.

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención se conecta operablemente a al menos un promotor.

- 35 Incluso se pueden utilizar 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 anfitrión bacteriano, fúngico o de levadura son muy conocidos en la técnica.

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

- 40 Construcciones

El término "construcción", sinónimo de términos tales como "producto conjugado", "casete" e "híbrido", incluye una secuencia de nucleótidos para su uso de acuerdo con la presente invención anclada directa o indirectamente a un promotor.

- 45 Un ejemplo de un anclaje indirecto es la provisión de un grupo espaciador adecuado, tal como una secuencia de intrones, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, entre el promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo es válido para el término "fusionada" en relación con la presente invención que incluye un anclaje directo o indirecto. En algunos casos, los términos no incluyen la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína asociada normalmente con el promotor del gen de tipo salvaje y cuando ambos se encuentran en su ambiente natural.

- 50 La construcción puede incluso contener o expresar un marcador que permite la selección de la construcción genética.

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

#### Células anfitrionas

5 El término “célula anfitriona”, en relación con la presente invención, incluye cualquier célula que comprende la secuencia de nucleótidos o un vector de expresión, como se describió anteriormente, y que se utiliza en la producción recombinante de una proteína que tiene las propiedades específicas que se definen en la presente memoria.

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

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

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

15 En una realización, las xilanasas que se ilustran en la presente memoria se expresan en el anfitrión de expresión *Trichoderma reesei*.

En algunas realizaciones, el anfitrión de expresión para las xilanasas que se ilustran en la presente memoria puede ser uno o más de los siguientes anfitriones de expresión fúngica: *Fusarium* spp. (tal como *Fusarium oxysporum*); *Aspergillus* spp. (tales como *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, o *A. awamori*) o *Trichoderma* spp. (tal como *T. reesei*).

20 En algunas realizaciones, el anfitrión de expresión puede ser uno o más de los siguientes anfitriones de expresión bacteriana: *Streptomyces* spp. o *Bacillus* spp. (por ejemplo, *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*). El uso de células anfitrionas adecuadas, tales como células anfitrionas de levadura y fúngicas, puede permitir las modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, miristoilación, glicosilación, truncamiento, lipidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) según sea necesario para conferir una actividad biológica óptima a los productos de expresión recombinante de la presente invención.

#### Organismo

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

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

Los organismos adecuados pueden incluir un procariota, hongo, levadura o un vegetal.

35 El término “organismo transgénico”, en relación con la presente invención, incluye cualquier organismo que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la presente invención y/o los productos obtenidos de allí y/o en donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención dentro del organismo. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos se incorpora al genoma del organismo.

El término “organismo transgénico” no abarca las secuencias codificantes de nucleótidos nativas en su ambiente natural cuando se encuentran bajo el control de su promotor nativo que está, además, en su entorno natural.

40 Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende cualquier o una combinación de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de acuerdo con la presente invención, construcciones de acuerdo con la presente invención, vectores de acuerdo con la presente invención, plásmidos de acuerdo con la presente invención, células de acuerdo con la presente invención, tejidos de acuerdo con la presente invención o los productos de los mismos.

45 Por ejemplo, el organismo transgénico puede comprender, además, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la presente invención controlada por un promotor heterólogo.

#### Transformación de células/organismos anfitriones

50 Como se indicó anteriormente, el organismo anfitrión puede ser un organismo procariótico o un organismo eucariótico. Los ejemplos de anfitriones procarióticos adecuados incluyen *E. coli*, *Streptomyces* spp. y *Bacillus* spp., por ejemplo, *Bacillus subtilis*.

Las enseñanzas sobre la transformación de anfitriones procarióticos están bien documentadas en la técnica, por ejemplo, véase Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>o</sup> edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Cuando se utiliza un anfitrión procariota, puede ser necesario modificar adecuadamente la secuencia de nucleótidos antes de la transformación, tal como mediante la eliminación de intrones.

- 5 Las células de hongos filamentosos pueden transformarse mediante el uso de varios métodos conocidos en la técnica, tales como un procedimiento que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida por la regeneración de la pared celular de una manera conocida. El uso de *Aspergillus* como microorganismo anfitrión se describe en el documento EP 0 238 023.

La transformación de procariotas, hongos y levaduras es muy conocida, generalmente, para un experto en la técnica.

- 10 Un organismo anfitrión puede ser un hongo, tal como un moho. Los ejemplos de anfitriones de este tipo 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 anfitrión puede ser un hongo. En una realización preferida, el organismo anfitrión pertenece al género *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*).

- 15 Cultivo y producción

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

- 20 El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer que la célula anfitriona en cuestión crezca y para obtener la expresión del polipéptido.

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

La proteína puede secretarse de las células anfitrionas y recuperarse convenientemente del medio de cultivo con el uso de procedimientos muy conocidos.

#### Secreción

- 25 Frecuentemente, se desea que la proteína se secrete del anfitrión de expresión al medio de cultivo desde donde la proteína puede recuperarse con más facilidad. De conformidad con la presente invención, la secuencia líder de secreción puede seleccionarse en función de un anfitrión de expresión deseado. Las secuencias señal híbridas se pueden utilizar, además, en el contexto de la presente invención.

#### Aplicación a gran escala

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

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 1 g por litro a aproximadamente 100 g por litro del volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo anfitrión.

- 35 De manera conveniente, la secuencia de aminoácidos puede producirse en una cantidad de 30 g por litro a aproximadamente 90 g por litro de volumen de cultivo celular total después del cultivo del organismo anfitrión.

#### Técnicas generales de la metodología del ADN recombinante

La presente invención emplea, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Tales técnicas se explican en la literatura. Véanse, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T.

- 40 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, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; y D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press.

La invención se describirá a continuación a modo de ejemplo únicamente con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Materiales y métodos

#### Plásmido y construcción de la genoteca

5 Una secuencia de ADN que contiene la región codificante para la xilanasa 4 (la familia GH10) del hongo filamentoso *Fusarium verticilloides*, FveXyn4, se amplificó a partir del ADN genómico con los cebadores específicos del gen extendida con los sitios attB1 y attB2 para permitir la clonación por recombinación Gateway® BP en el vector pDonor221 (Invitrogen, EE.UU.). El plásmido pEntry-FveXyn4, como se muestra en la Figura 20, fue utilizado por los proveedores BaseClear (Países Bajos) y Genearth GmH (Alemania) como molde para la construcción de genotecas combinatorias.

Las variantes de FveXyn4 se generaron ya sea como genotecas combinatorias o por introducción de mutaciones específicas y se diseñaron para incluir cantidades y combinaciones diferentes de las mutaciones presentadas en la Tabla 1. Las variantes A, B, C, D y E y las variantes del Ejemplo 12 se incluyeron en estas variantes.

15 Las variantes combinatorias se generaron por medio de una técnica de recombinación Gateway® (Invitrogen, EE.UU.) con el vector de destino pTTTpyr2 (Figura 21). Los plásmidos de expresión resultantes pTTTpyr2-FveXyn4\_VAR que expresan Xyn4 con diferentes mutaciones se amplificaron en la cepa DH5a de *Escherichia coli*, se purificaron, se secuenciaron y se dispusieron individualmente en 96 MTP, y se utilizaron para la transformación fúngica como se describe más adelante. El vector de expresión contiene las regiones del terminador y del promotor de *cbhl* de *T. reesei* 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 un medio mínimo con acetamida en ausencia de uridina. Los plásmidos se mantienen autónomamente en la célula fúngica debido a las regiones teloméricas derivadas de *T. reesei*. El uso de plásmidos replicativos produce frecuencias incrementadas de transformación y elude los problemas de la expresión dependiente del locus observados con la transformación integrativa fúngica.

25 Las mutaciones específicas se introdujeron en la secuencia genómica de la xilanasa Xyn4 de *Fusarium verticilloides* por medio de síntesis génica *de novo* (GeneArt GmbH, Alemania). Después, las variantes sintéticas fueron clonadas por el proveedor en el vector de destino pTTT-pyr2 por medio de una técnica de recombinación Gateway (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.).

#### Cepas fúngicas, medios de crecimiento y transformación

30 Los plásmidos de expresión (5-10 ul) se transformaron mediante el uso del método de tratamiento de protoplastos con PEG en una cepa de *T. reesei* en la que se suprimieron las celulasas principales y xilanasa 2 ( $\Delta cbh1 \Delta cbh2 \Delta egl1 \Delta egl2 \Delta egl3 \Delta egl4 \Delta egl5 \Delta egl6 \Delta bgl1 \Delta man1 \Delta xyn2$  *Prdiv: iRNAxyn1 xyn3: amdS pyr2*). La regulación por disminución adicional del fondo de xilanasa 1 y 3 endógeno se logró, además, al introducir en el genoma de la cepa anfitriona un casete de interferencia de ARN (ARNi) dirigido a "suspender" la expresión de *xyn1* y *xyn3* simultáneamente. Todas las transformaciones de alto rendimiento se llevaron a cabo robóticamente en un formato de MTP de 24 pocillos mediante el uso de robots Biomek (Beckman Coulter, EE.UU.). Los plásmidos con variantes se recibieron de los proveedores en las MTP de 96 pocillos dispuestas de acuerdo con un diseño predeterminado. Las mezclas de transformación que contenían aproximadamente 1 µg de ADN y 5x 10<sup>6</sup> protoplastos en un volumen total de 50 µl se trataron con 200 ul de solución de PEG al 25%, se diluyeron con 1 volumen de solución de sorbitol 1,2 M/Tris 10 mM, pH de 7,5/solución de CaCl<sub>2</sub> 10 mM de, se volvieron a disponer robóticamente en las MTP de 24 pocillos y se mezclaron con 1 ml de medio mínimo de agarosa al 3% que contenía sorbitol 1M y NH<sub>4</sub>Cl 10 mM. Después del crecimiento de los transformantes, las esporas de cada pocillo se agruparon y volvieron a colocar en MTP de 24 pocillos de nueva aportación con MM que contenía acetamida para una presión selectiva adicional. Una vez esporuladas, las esporas se recolectaron y utilizaron para la inoculación de cultivos líquidos ya sea en un formato 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 casaminoácidos, 10 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 33 g/L de ácido 1,4-piperazinabis(propanosulfónico), pH de 5,5, 2,5 ml/L de solución de elementos traza para *T. reesei*, 400X, (175 g/L de ácido cítrico, 200 g/L de FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 16 g/L de ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 3,2 de g/L CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O, 1,4 de g/L MnSO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O, 0,8 g/L de ácido bórico). Se añadió 1 ml de medio para producir variantes en las MTP de 24 pocillos.

50 Para los matraces de agitación, se aumentaron proporcionalmente los volúmenes.

Las placas se cultivaron durante 6 días a 28°C y 80% de humedad con agitación a 200 rpm. Los sobrenadantes del cultivo se recolectaron por filtración a vacío y se utilizaron para analizar su rendimiento y el nivel de expresión.

Para la producción a mayor escala, la fermentación se realizó en un reactor autoclave de 6 litros con agitación continua. Los matraces de agitación se inocularon con las esporas y se incubaron con agitación durante 3 días a 28°C en el siguiente medio de matraz de agitación: 5 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4,5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 14,4 g/L de ácido cítrico x1H<sub>2</sub>O, 1 g/L de CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, 27,5 g/L de glucosa, 1 gota de agente antiespumante (EROL DF 6000K). El pH se ajustó con NaOH (2M) a 5,5, y el medio se colocó en el autoclave 20 minutos a 122°C. Después de enfriarse,

se añadieron 2,5 ml/L de solución de elementos traza para *T. reesei*, 400 X, (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 utilizaron para inocular el biorreactor que contenía el siguiente medio de biorreactor: 4,7 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 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 solución de elementos traza para *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 continuamente mediante la adición de hidróxido de amonio al 20%. El oxígeno disuelto se controló a un mínimo de saturación de 40% al variar la velocidad de agitación. Se realizó la medición del dióxido de carbono liberado y el contenido de oxígeno. Cuando se agotó la glucosa inicial, se inició una alimentación constante de glucosa/soforosa. Al mismo tiempo, se redujo la temperatura hasta, y se controló a, 28°C; el pH se aumentó hasta, y se controló a, 4,5. La fermentación finalizó después de 140 horas. Se extrajo el caldo del tanque, y las células se separaron por filtración. Después de separar las células, el producto filtrado se concentró por ultrafiltración. Finalmente, el producto concentrado se filtró por esterilización y se utilizó para estudios de estabilidad del producto peletizado.

#### 15 Muestras de enzimas

La actividad xilanasa de los sobrenadantes del cultivo de la MTP se determinaron mediante el uso del método para medir la actividad xilanasa como se describe a continuación. Los sobrenadantes del cultivo se diluyeron 20 y 130 veces en acetato de sodio 25 mM, NaCl 250 mM, pH de 4,0. Se mezclaron 25  $\mu\text{L}$  de una muestra de enzima diluida con 150  $\mu\text{L}$  de sustrato WE-AX al 0,5%, pH de 5,0, y se incubó a 30°C durante 15 min con agitación. Después de la incubación, se mezclaron 45,4  $\mu\text{L}$  de la muestra de reacción con 135  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de PAHBAH y se incubó a 95°C por 5 min antes de enfriarse a 20°C durante 10 s. Una muestra de 100  $\mu\text{L}$  se transfirió a un pocillo de una placa de microtitulación, y la lectura de la placa se realizó a 410 nm.

La actividad se calculó como el promedio de tres réplicas tras restar un blanco que incluía acetato de sodio 25 mM, NaCl 250 mM, pH de 4,0 en lugar de la enzima. La concentración de proteína de las muestras se calculó en función de una curva patrón de FveXyn4 purificada (SEQ ID No. 1). Todas las muestras se diluyeron a 50 ppm en acetato de sodio 25 mM, NaCl 250 mM, pH de 4,0. Estas muestras normalizadas se utilizaron como solución de partida enzimática en los ensayos que se describen más adelante.

La concentración proteínica de la solución de partida enzimática se determinó por HPLC como se describe más adelante.

La actividad xilanasa de productos concentrados esterilizados por filtración de la producción a gran escala se determinó con el siguiente ensayo de actividad. Se pesaron 0,5 g de cada producto concentrado en matraces volumétricos de 100 ml seguido del llenado hasta el volumen con tampón de Mcllvaine, pH de 5,0. Las muestras se diluyeron hasta aprox. 6 UX/ml mediante el uso del tampón de Mcllvaine, pH de 5,0. Se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de muestra diluida a 1 ml de tampón de Mcllvaine, pH de 5,0, en tubos de ensayo y se equilibró a 40°C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (100 mg) para iniciar la reacción, y las muestras se incubaron a 40°C durante 10 min antes de detener la reacción añadiendo 10 ml de Tris al 2%, pH de 12,0. La solución se mezcló con un mezclador de vórtice, se dejó reposar durante 5 min y se mezcló nuevamente antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado. La actividad xilanasa se cuantificó con relación a un patrón enzimático (Danisco Xylanase, disponible en Danisco Animal Nutrition).

La enzima utilizada como patrón comparativo, Econase® XT, está disponible comercialmente y se extrajo de muestras comerciales formuladas en seco. El componente xilanasa de las muestras comerciales formuladas en seco de Econase® XT se extrajo en una suspensión espesa al 33% (p/p) mediante el uso del tampón de Mcllvain, pH de 5,0. El extracto se aclaró mediante el uso de centrifugación (3000 RCF durante 10 min) y se filtró mediante el uso de un filtro de jeringa PALL Acrodisc PF (membrana Supor de 0,8/0,2  $\mu\text{m}$ ) y, posteriormente, se calentó a 70°C durante 20 min. Después de separar el precipitado por centrifugación (38 724 RCF durante 15 min), el tampón se reemplazó mediante pase a través de una columna de Sephadex G25 (PD10 de Pharmacia) equilibrada con citrato de Na 20 mM, NaCl 20 mM, pH de 3,4. La purificación del componente xilanasa se llevó a cabo con el uso de la resina Source 15S, seguido de elución con un gradiente salino de incremento lineal (NaCl en tampón de citrato de Na 20 mM, pH de 3,4).

Econase XT® es una endo-1,4- $\beta$ -xilanasa (EC 3.2.1.8) producida por la cepa *Trichoderma reesei* RF5427 (CBS 114044), disponible de ABVista.

La concentración de proteína se determinó al medir la absorción a 280 nm. Los coeficientes de extinción fueron estimados a partir de las secuencias de aminoácidos. Para la Econase XT, se calculó que la absorción a 280 nm de 1 mg/ml fue de 2,84 UA.

#### Determinación de proteínas por HPLC

Se utilizó una MTP (Agilent parte núm. 5042-1385) que contenía 100  $\mu\text{L}$  de solución de partida enzimática con una concentración aproximada de 50 ppm por pocillo para el método de determinación de proteínas por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). Se utilizó HPLC Agilent 1260 o 1290 (Hewlett Packard) equipado con una columna Acuity UPLC BEH 125 SEC (Waters) para separar los contaminantes restantes. La muestra se eluyó de la columna,

mediante el uso de tampón de fosfato sódico 25 mM, pH de 6,8, que contenía cloruro sódico 250 mM. La absorbancia se midió a 220 nm, se integró con el uso del programa Chemstation (Agilent Technologies) y la concentración de proteínas de las muestras se determinó en base a una curva patrón de proteína FveXyn4/enzima purificada que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 1.

#### 5 Medición de la actividad xilanasas

La actividad xilanasas de muestras enzimáticas se determinó por la medición de la cantidad de azúcares reductores liberados de trigo hidrolizado WE-AX (arabinoxilano extraíble en agua). La cantidad de azúcares reductores se midió mediante el método PAHBAH. En resumen, por medio de condiciones de calor y alcalinas los grupos terminales reductores reaccionan con el PAHBAH incoloro (hidrazida de ácido 4-para-hidroxibenzoico), por lo cual el PAHBAH se oxida y la absorbancia se mide a 410 nm (Lever, 1972).

Se preparó sustrato WE-AX al 0,5%, pH de 5,0 mediante la humectación de 0,25 g de arabinoxilano de trigo soluble (por ejemplo, Megazyme, viscosidad alta ~43 cSt, P-WAXYH) con 2,5 ml de etanol del 96% antes de añadir 50 ml de acetato sódico 0,1 M, pH de 5,0. La determinación de la actividad patrón se llevó a cabo a un pH de 5,0. Para la medición a otros valores de pH, los 50 ml de acetato sódico 0,1 M, pH de 5,0 se sustituyeron por el tampón indicado. La solución se calentó con agitación hasta la ebullición y se enfrió con agitación hasta temperatura ambiente.

Se preparó la solución de trabajo de PAHBAH por medio del mezclado de solución de partida de PAHBAH al 5% (4-hidroxibenzidrazida, por ejemplo, Sigma-Aldrich H9882) en HCl 0,5 M con NaOH 0,5 M a una razón 1:4 (v/v). La solución se preparó el día del análisis y se protegió de la luz.

Las muestras enzimáticas se diluyeron en el tampón indicado a una concentración de 1 µg/ml antes del análisis. Se mezclaron 25 µL de una muestra de enzima diluida con 150 µL de sustrato WE-AX al 0,5%, pH de 5,0, y se incubaron a 30°C durante 15 min con agitación. Después de la incubación, se mezclaron 45,4 µL de la muestra de reacción con 135 µL de solución de trabajo de PAHBAH y se incubaron a 95°C durante 5 min antes de enfriarse a 20°C durante 10 s. Una muestra de 100 µL se transfirió a un pocillo de una placa de microtitulación, y la lectura de la placa se realizó a 410 nm. La actividad se calculó como la media de tres réplicas tras restar un blanco que incluía el tampón de dilución adecuado en lugar de enzima.

#### Ensayo para la medición de la termoestabilidad

Los perfiles de desnaturalización térmica de las variantes de FveXyn4 se determinaron mediante la dilución y preincubación de las muestras enzimáticas en tampón MES 25 mM, (Tween 80 0,00125% –tampón MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 al 0,00125% (V:V)), pH 6,0 durante 10 min a temperaturas variables (66, 66,7, 68,2, 70,6, 73,5, 76,8, 79,7, 81,9, 83,5, 84,6 y 85°C, respectivamente) y, después, la medición de la actividad residual con el método de la actividad xilanasas descrito anteriormente. La actividad medida sin preincubación se fijó en 100%, y la actividad residual de cada variante a cada una de las temperaturas se calculó con respecto a esta. El valor de T<sub>m</sub> se calculó a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la que se obtiene 50% de la actividad residual.

#### Perfil de pH

El perfil de pH de las variantes de FveXyn4 se analizó por medio de la medición de la actividad a pH 4,0, 5,0 y 6,0. La actividad se midió, esencialmente, como se describe en el método de la actividad xilanasas descrito anteriormente. Las muestras enzimáticas se diluyeron en acetato de sodio 0,1 M, pH de 4,0, acetato de sodio 0,1 M, pH de 5,0, BSA al 0,1% (por ejemplo, Sigma A7906) o tampón de Mcllvaine, pH 6,0, para determinar la actividad a pH 4,0, 5,0 o 6,0, respectivamente, antes del análisis. Se preparó sustrato WE-AX al 0,5% a pH 4,0 y 6,0 como se describió para el sustrato WE-AX al 0,5%, pH 5,0, pero, el acetato de sodio 0,1 M, pH 5,0 se sustituyó por acetato sódico 0,1 M, pH 4,0 o tampón de Mcllvaine, pH 6,0, respectivamente. Todos los datos se calculan con respecto a FveXyn4 a pH 5,0.

#### Solubilización de pentosana (solubilización de AXinsol)

El sustrato utilizado para medir la solubilización de pentosana por variantes de FveXyn4 fue DDGS de maíz y salvado de trigo. Se transfirieron 100 mg de cDDGS o salvado de trigo con un tamaño de partícula < 212 µm a un tubo Eppendorf de 2 ml y se registró el peso exacto. Se añadieron 750 µl de tampón de incubación (HEPES 200 mM, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 6,0) y 900 µl de cloranfenicol (40 µg/ml en tampón de incubación). Se añadieron dosis de enzimas cada vez mayores para conformar un volumen total de 1,8 ml.

Cada muestra se ensayó por duplicado en paralelo con una muestra de control (sin enzima). Las muestras se incubaron a 40°C con agitación. Después de 18 horas de incubación el sobrenadante se filtró con el uso de placas de filtro de 96 pocillos (Pall Corporation, AcroPrep 96 Filter Plate, 1,0 µm Vidrio, NTRL, pocillo de 1 mL). Después de la filtración, las muestras se almacenaron a 4°C hasta el análisis de la cantidad total de azúcares C5, arabinosa y xilosa.

#### Cuantificación de azúcares C5 (pentosanas)

La cantidad total de pentosas incorporadas a la solución se determinó mediante el método de Rouau y Surget (1994) con un aparato de inyección de flujo continuo. Los sobrenadantes se trataron con ácido para hidrolizar los polisacáridos

a monoazúcares. Se añadió floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno) para la reacción con monopentosas y monohexosas, que forma un complejo coloreado.

Al medir la diferencia en la absorbancia a 550 nm en comparación con 510 nm, la cantidad de pentosas en la solución se calculó con el uso de una curva patrón. A diferencia del complejo de pentosa-floroglucinol, la absorbancia del complejo de hexosa-floroglucinol es constante a estas longitudes de onda. Se añadió glucosa a la solución de floroglucinol para crear una señal de glucosa constante y asegurar, además, que no hubiera interferencia de los azúcares hexosas. La concentración de pentosa en las muestras se determinó con el uso de una curva patrón de xilosa.

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

La reducción de la viscosidad en trigo se determinó con el uso de una versión modificada del procedimiento descrito por Bedford & Classen (1993 Poultry Sci., 72, 137-143). Se mezclaron 3,6 mL de solución de pepsina (2000 U/mL en HCl 0,1 N) con 2,4 g de trigo antes de la adición de la cantidad indicada de xilanasa (variantes de FveXyn4) seguido de 45 min de incubación a 40°C. Después, se mezclaron 1,2 ml de solución de pancreatina (8 mg/mL en MES 1 M, pH 6,8) en la suspensión espesa para producir un pH final de 6,0. La muestra se dejó incubando durante 60 min a 40°C mezclando después de 30 y 60 min. Después, la muestra se colocó sobre hielo durante 5 min para detener la reacción y se centrifugó 10 min a 3320 RCF seguido por filtración a través de un filtro de 0,45 µm para obtener un sobrenadante transparente. Después, se determinó la viscosidad de la muestra a 20°C con un viscosímetro digital Brookfield (modelo DV-1+, Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA 02172, Estados Unidos) equipado con un cono CPE-40 y placa. Cada punto de datos es el promedio de tres repeticiones.

Estabilidad de la peletización

Las pruebas de peletización se realizaron a escala completa en el Technological Institute, Kolding, Dinamarca. Cada producto concentrado de xilanasa filtrado en condiciones estériles se formuló en trigo y se mezcló en una mezcla de pienso de maíz/soja (61,1% de maíz, 31,52% de Hipro Soya 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). Se preparó una premezcla mezclando las variantes de xilanasa formuladas en trigo en 10 kg de mezcla de pienso de maíz/soja y se mezcló durante 10 min. Después, la premezcla se añadió a 120 kg de pienso y se mezcló durante 10 min antes del acondicionamiento. El pienso se acondicionó durante 30 s a 90 y 95°C antes de la peletización. El producto macerado y los pélets de pienso resultantes se trituraron con un molino de laboratorio Perten (es importante que el triturado de todas las muestras sea igual), antes de analizar la actividad xilanasa en las muestras de acuerdo con el método de obtención de extracto o suspensión espesa descrito más abajo con el uso de arabinoxilano entrecruzado con azurina a partir de trigo (por ejemplo, tabletas de Xylazyme, Megazyme, Irlanda) como sustrato.

Método de obtención del extracto: Se mezclaron 5,0 g de muestra triturada con 50 ml de tampón de Mcllvaine, pH 5,0 y se agitaron en un agitador magnético durante 10 min. El extracto se filtró a través de un filtro de fibra de vidrio y se diluyó 3-6 veces en 50 ml de tampón de Mcllvaine, pH 5,0. Se mezclaron 100 µl de extracto diluido con 400 µL de tampón de Mcllvaine, pH de 5,0 que se equilibró a 50°C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (60 mg) para iniciar la reacción, y las muestras se incubaron a 50°C durante 60 min antes de detener la reacción mediante la adición de 5 ml de Tris al 2%, pH de 12.0. La solución se mezcló con un mezclador de vórtice, se dejó reposar durante 5 min y se mezcló nuevamente antes de centrifugarse a 3500 rpm durante 10 min. La absorbancia del sobrenadante se determinó a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado.

La actividad xilanasa se cuantificó con el uso de una curva patrón de xilanasa preparada mediante el uso de cada una de las variantes de xilanasa en un blanco de producto macerado (sin enzima) y pienso a 90°C. La xilanasa formulada de trigo respectiva se extrajo durante 10 min en tampón de Mcllvaine, pH 5,0 para obtener una concentración de 160 UX/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 blanco de producto macerado triturado y pienso a 90°C. La actividad xilanasa en estas muestras patrón se determinó según se describe en el método de obtención de extracto anterior. Cada curva patrón se preparó una vez.

Método de obtención de suspensión espesa: Se mezclaron 1,0 g de muestra triturada con 50 ml de tampón de Mcllvaine, pH 5,0 y se agitó en un agitador magnético en un baño maría a 50°C durante 2 min. Se añadió un comprimido de Xylazyme (100 mg) para iniciar la reacción y las muestras se incubaron con agitación a 50°C durante 20 min (30 min para la Variante B). Después de la incubación, las muestras se filtraron a través de un filtro de fibra de vidrio y la absorbancia del sobrenadante se midió a 590 nm. Cada muestra se midió por duplicado.

La actividad xilanasa se cuantificó con una curva patrón de xilanasa preparada para cada una de las variantes de xilanasa en un blanco de pienso de producto macerado (sin enzima). La xilanasa formulada de trigo respectiva se extrajo durante 10 min en tampón de Mcllvaine pH 5,0 para obtener una concentración de 30 UX/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 a muestras 1,0 g de blanco de pienso de producto macerado triturado. La actividad xilanasa en estas muestras patrón se midió como se describe en el método de obtención de suspensión espesa anterior. La curva patrón se preparó una vez.

La recuperación medida en el pienso de producto macerado se ajustó a 100% y la actividad residual del pienso a 90 y 95°C se calculó con respecto a esto.

*Resultados y Discusión*

Después de un trabajo significativo se identificaron cinco variantes de la xilanasa esqueleto FveXyn4.

- 5 Las cinco variantes son extremadamente más termoestables que la molécula de referencia/parental, FveXyn4, como se muestra en la Figura 11.

La caracterización adicional de la variante basándose en las propiedades bioquímicas y de rendimiento importantes para una xilanasa que se utilizará, por ejemplo, en aplicaciones de pienso identificó estas variantes como aquellas que eran termoestables y tenían una actividad de rendimiento/bioquímica adecuada.

<b>Tabla 1.</b> Visión general de mutaciones en las cinco variantes de FveXyn4	
<b>Variantes</b>	<b>Mutaciones</b>
<b>A</b>	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_K79Y_S89G_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S193Y_A217Q_G219P_T298Y
<b>B</b>	N7D_N25P_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_T103M_V115L_N147Q_G181Q_S193Y_A217Q_G219P_T298Y
<b>C</b>	N7D_N25P_T33V_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
<b>D</b>	N7D_T33V_S57Q_N62T_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
<b>E</b>	N7D_N25P_T33V_G64T_K79Y_S89G_A217Q_T298Y
La numeración está basada en la secuencia madura de FveXyn4. SEQ ID No. 1	

- 10 La Figura 11 muestra el valor de Tm de las 5 variantes A, B, C, D y E en comparación con FveXyn4. El valor de Tm se mide como la temperatura a la cual se obtiene 50% de actividad residual después de 10 min de incubación.

La Figura 12 muestra el perfil de pH de las cinco variantes medido a pH 4,0, 5,0 y 6,0 y todos los datos están en relación con la variante de tipo salvaje a pH 5,0. Las cinco variantes tienen un perfil de pH que es ideal para utilizar, por ejemplo, en aplicaciones para pienso.

- 15 Las Figuras 13a y 13b muestran curvas de respuesta a la dosis en la solubilización de la pentosana a partir de DDGS de maíz y salvado de trigo, respectivamente, por las cinco variantes. Las cinco variantes muestran una gran capacidad para solubilizar arabinoxilano (pentosana) a partir de DDGS y salvado de trigo y todas al mismo nivel que la molécula wt. Las cinco variantes son muy adecuadas para utilizar, por ejemplo, en pienso para animales.

- 20 La Figura 14 muestra la reducción de la viscosidad en la "Reducción de la viscosidad en el ensayo de un modelo animal *in vitro*" que se ilustra en el Ejemplo 1. Las cinco variantes muestran una capacidad alta para reducir la viscosidad y todas en el mismo nivel que la molécula wt y fueron mucho mejores que la Econase XT de referencia.

La Figura 15 muestra una recuperación de xilanasa en el pienso después de la granulación a 90 y 95°C. Las cinco variantes muestran una recuperación alta de xilanasa después de la peletización y significativamente más alta que la variante de tipo salvaje.

- 25 Ejemplo 2

Clonación de la xilanasa *esqueleto (parental) de Fusarium verticillioides (FveXyn4)*

- 30 Se utilizó el ADN genómico aislado de una cepa de *Fusarium verticillioides* para amplificar un gen de xilanasa. La secuencia del gen clonado, denominado gen *FveXyn4*, se muestra en SEQ ID No. 2. La proteína madura codificada por el gen *FveXyn4* se muestra en SEQ ID No. 1. El producto proteínico del gen *FveXyn4* pertenece a la familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10) según la búsqueda en PFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

Ejemplo 3

Expresión de la proteína *esqueleto (parental) de FveXyn4*

- 35 El gen *FveXyn4* se amplificó a partir del ADN genómico de *Fusarium verticillioides* mediante el uso de los siguientes cebadores: Cebador 1 5'-caccATGAAGCTGTCTTCTTCTCCTA-3' (SEQ ID No. 22) y cebador 2 5'-TTTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAGC-3' (SEQ ID No. 23). El producto de PCR se clonó en el vector pENTR/D-TOPO (Invitrogen K2400) para generar el plásmido *FveXyn4* pEntry. El plásmido de expresión pZZH<sub>2</sub>54 se obtuvo por reacción de clonación Gateway entre el plásmido *FveXyn4* pEntry y el vector de expresión pTrex3gM (descrito en la Patente de los EE.UU. núm. 2011/0136197 A1) mediante el uso del estuche para enzimas Gateway® LR Clonase® II (Invitrogen 11791). Se proporciona un mapa del plásmido pZZH<sub>2</sub>54 en la Figura 16. La secuencia del gen *FveXyn4* se

confirmó por secuenciación de ADN (SEQ ID No. 2). El plásmido pZZH254 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* con cuatro deleciones (descrita en el documento WO 05/001036) mediante el uso del método biolístico (Te'o VS *et al.*, J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002).

Después de la confirmación de la secuencia, los protoplastos de una cepa de *T. reesei* con cuatro deleciones (descrita en el documento WO 05/001036) se transformaron con el plásmido de expresión pZZH254 mediante el uso del método de tratamiento de protoplastos con PEG (Penttila *et al.*, *Gene*, 61:155-164, 1987). Para la preparación de los protoplastos, se cultivaron esporas durante aproximadamente 10 horas a 24°C en medio mínimo MM para *Trichoderma* (20 g/L de glucosa, 15 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH de 4,5, 5 g/L de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,6 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,6 g/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1 ml de *T. reesei*, 1000X, solución de elementos traza (175 g/L de ácido cítrico anhidro, 200 g/L de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 16 g/L de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3,2 g/L de CuSO<sub>4</sub>, 1,4 g/L de MnSO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O y 0,8 g/L de ácido bórico). Las esporas en germinación se recolectaron por centrifugación y se trataron con 30 mg/mL de solución de Vinoflow FCE (Novozymes, AG Suiza) por un período de 7 horas hasta toda la noche a 30°C a 100 rpm para la lisis de las paredes celulares fúngicas. Los protoplastos se lavaron con tampón Tris HCl 0,1 M (pH de 7) que contenía sorbitol 0,6 M y se resuspendieron en tampón Tris HCl 10 mM (pH de 7,5) que contenía sorbitol 1,2 M y cloruro de calcio 10 mM. Para la transformación con PEG, se trataron aproximadamente 1 µg de ADN y 1-5 x 10<sup>7</sup> protoplastos en un volumen total de 200 µl con 2 ml de solución de PEG al 25%, diluida con 2 volúmenes de solución de sorbitol 1,2 M/Tris 10 mM, pH de 7,5/CaCl<sub>2</sub> 10 mM. Se seleccionaron los transformantes en un medio que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (0,6 g/L de acetamida; 1,68 g/L de cloruro de cesio; 20 g/L de glucosa; 15 g/L de dihidrogenofosfato de potasio; 0,6 g/L de sulfato de magnesio heptahidratado; 0,6 g/L de cloruro de calcio dihidratado; 5 mg/L de sulfato de hierro (II); 1.4 mg/L de sulfato de zinc; 1 mg/L de cloruro de cobalto (II); 1,6 mg/L de sulfato de manganeso (II); 20 g/L de agar; pH de 4,25). Las colonias transformadas (de aproximadamente 50 a 100) aparecieron en aproximadamente una (1) semana. Después del cultivo en placas con acetamida, las esporas se recolectaron y se volvieron a seleccionar en placas con acetamida. Después de 5 días, las esporas se recolectaron mediante el uso de glicerol al 10%, y 1 x 10<sup>8</sup> esporas se inocularon en un matraz de agitación de 250 ml con 30 ml de medio definido de glucosa/soforosa para la expresión de proteínas. La expresión de proteínas se confirmó por SDS-PAGE. La suspensión de esporas se cultivó, posteriormente, en un fermentador de 7 L en un medio definido que contenía un suministro de 60% de glucosa-soforosa. El medio definido de glucosa/soforosa (por litro) consiste en (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, tampón PIPPS 33 g, casaminoácidos 9 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4,5 g, CaCl<sub>2</sub> (anhidro) 1 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g, pH a 5,5 ajustado con NaOH al 50% con Milli-Q H<sub>2</sub>O para llevarlo a 966,5 mL. Después de la esterilización, se añadió lo siguiente: 26 mL de 60% de glucosa/soforosa y 2,5 mL de solución de metales traza para *T. reesei*, 400X.

FveXyn4 se purificó a partir de un caldo de fermentación concentrado de un cultivo de fermentador de 7 L mediante el uso de dos columnas de cromatografía. El caldo de fermentación concentrado tamponado en tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH de 6,0, que contenía sulfato de amonio 1 M se cargó en una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (Fenil Sepharose FF, 26/10). La proteína se eluyó de la columna mediante el uso de un gradiente lineal de tampón de equilibrio/lavado a tampón de fosfato de sodio 20 mM, pH de 6,0. La fracción que contenía la proteína FveXyn4 se cargó en una columna de filtración en gel (HiLoad Superdex 75 pg 26/60), y la fase móvil utilizada fue fosfato de sodio 20 mM, pH de 7,0, que contenía NaCl 0,15 M. La proteína purificada se concentró mediante el uso de un dispositivo 3K Amicon Ultra-15, y la fracción de proteína concentrada se utilizó en otros estudios.

La secuencia de nucleótidos del gen *FveXyn4* se describe como SEQ ID No. 24. La secuencia señal se muestra en negrita (letras mayúsculas), y el intrón predicho se muestra en negrita y minúsculas.

La secuencia de aminoácidos de la proteína FveXyn4 se describe como SEQ ID No. 26. La secuencia señal predicha por el programa SignalP-NN se muestra subrayada. Esta es la preproteína.

La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína FveXyn4 se describe como SEQ ID No. 1. Esta es la forma activa de la enzima. SEQ ID No. 27 muestra la proproteína, es decir, antes de la modificación posterior a la traducción. Dependiendo del anfitrión, la modificación posterior a la traducción puede variar y, por lo tanto, la presente invención abarca, además, las formas activas maduras de SEQ ID No. 27.

#### Ejemplo 4

##### Actividad xilanasa de FveXyn4 (una xilanasa parental)

FveXyn4 pertenece a la familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10, número CAZy). La actividad beta 1-4 xilanasa de FveXyn4 se determinó mediante el uso de xilano al 1% de madera de abedul (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1% de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM) como sustratos. En ensayo se llevó a cabo en citrato de sodio 50 mM, pH de 5,3, tampón Tween-80 al 0,005% a 50°C durante 10 minutos.

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

Ejemplo 5

Perfil de temperatura de FveXyn4 (una xilanasa parental)

- 5 La temperatura óptima de FveXyn4 purificada (una enzima parental) se determinó por el ensayo de la actividad xilanasa a temperaturas que varían de 40°C a 75°C durante 10 minutos en tampón de citrato sódico 50 mM a pH 5,3. La actividad fue referida como actividad relativa, en donde la actividad a la temperatura óptima se fijó en 100%. El perfil de temperatura de FveXyn4 se muestra en la Figura 17. Se determinó que FveXyn4 tenía una temperatura óptima de 60°C y se determinó que retenía más de 70% de la actividad máxima entre 45°C y 64°C.

Ejemplo 6

Reducción de la viscosidad en el material a base de grano (por ejemplo, para la producción de biocombustibles)

- 10 Reducción de la viscosidad del trigo

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

- 15 La razón a la cual los NSP diferentes están representados difieren para cada provisión de partida. La Tabla 1 ilustra las distintas cantidades de NSP en trigo, cebada y centeno en comparación con otras provisiones de partida.

Tabla 1: Polisacáridos no amiláceos presentes en distintas provisiones de partida (g kg<sup>-1</sup> de materia seca)<sup>1,2</sup>

	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 solubles y no solubles <sup>3</sup>	75	89-99	116-136	144	114	150	113
NSP total	97	107-119	132-152	186	124	232	116

1 (Bach Knudsen, 1997) Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. Anim. Feed Sci. Technol., 67 (4): 319-338  
 2 Englyst, H. N., Anderson, V. and Cummings, J. H., 1983. Starch and non-starch polysaccharides in some cereal foods. J. Sci. Food Agric., 34: 1434-1440.  
 3 Polisacáridos no celulósicos, pentosanas, (arabino)xilanos y otras hemicelulosas

- 20 Los NSP proporcionan viscosidad alta a productos macerados de granos. La viscosidad alta tiene un impacto negativo en la producción de etanol ya que limitará la concentración de sólidos que se puede utilizar en la formación del producto macerado y reducirá la eficacia de la energía del procedimiento. Además, las hemicelulosas residuales presentes durante el procedimiento pueden contribuir a la contaminación en cambiadores de calor y equipos de destilación. El mayor impacto de una alta viscosidad se observa cuando un producto macerado hasta la temperatura de fermentación (32°C). Esto explica la necesidad de reducir la viscosidad en algún momento del procedimiento antes de la etapa de enfriamiento. En función del procedimiento utilizado, se requieren enzimas que actúen a 60°C y/u 85°C.

- 25 Las enzimas reductoras de viscosidad pueden añadirse en etapas diferentes del procedimiento de producción de etanol: mezclado y/o sacarificación/fermentación. Preferiblemente, las enzimas se añaden en el mezclado para descomponer la viscosidad inicial.

Los beneficios de utilizar enzimas de reducción de viscosidad en el procedimiento de producción de etanol son múltiples:

- 30
- Se puede utilizar un producto macerado de sustancia más seca en el procedimiento
  - Puede obtenerse un jarabe final con un contenido de sólidos más alto
  - Mayor transferencia de calor, menor requerimiento de energía
  - Menor contaminación del evaporador que reduce los costes de limpieza
  - Mayor producción del etanol final
- 35
- Mejor calidad de los DDGS

Métodos

Se utilizó un analizador Rapid Visco Analyzer (RVA 4500) de Perten Instruments para determinar los perfiles de viscosidad de un producto macerado de trigo. Este producto macerado de trigo se preparó de acuerdo con el protocolo siguiente:

- 5 Se preparan 60 gramos de DS al 30% (34,65% 'en el estado en el que está') de suspensión de trigo (para pruebas simultáneas en dos RVA) de la siguiente manera:
  - Se pesan 20,80 gramos de trigo
  - En un vaso de vidrio de 100 ml, se pesan 39,20 gramos de agua corriente y se añaden 137 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N
  - Se añade el trigo al agua y se agita durante 5 minutos a velocidad máxima (aprox. 500 rpm) con un agitador vertical
- 10 - Se transfieren 25,0 gramos de suspensión a un vaso del RVA, se añaden enzimas diluidas 50 veces y se inicia la prueba con el RVA (se controla si el pH inicial es de aproximadamente 5,3)
  - Se controla el pH al final de la prueba con RVA (5,6-5,7)

15 En cada experimento (25 gramos de suspensión espesa), la xilanasa se dosificó a 25 µg de proteína (por 8,66 g de trigo 'en el estado en el que está'), que corresponde a 2,9 µg de proteína/g de trigo 'en el estado en el que está'. Se dosificó SPEZYME® CL a 0,15 kg/TM de trigo 'en el estado en el que está' (2,2 UAA/g 'en el estado en el que está' o 2,6 UAA/g de DS).

20 Una licuefacción de trigo convencional se imitó en el RVA. El pretratamiento se realizó durante 20 minutos a 60°C, seguido de una etapa de licuefacción durante 30 minutos a 85°C. Después del pretratamiento y la licuefacción, la suspensión se enfrió hasta 32°C, para determinar la viscosidad en las condiciones de fermentación. El pH de la licuefacción se mantuvo entre 5,3 y 5,7.

En este experimento, el rendimiento de FveXyn 4 se comparó con las variantes A, B, C, D y E.

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

Los resultados se muestran anteriormente y en la Figura 22.

Estos datos muestran que FveXyn4 y todas las variantes funcionan de manera muy similar, mostrando una reducción de la viscosidad de 55-67% en comparación con el blanco (solo SPEZYME® CL).

25 Ejemplo 7

Separación del gluten-almidón del trigo

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

30

## 7.1 Materiales y métodos

El siguiente ensayo simula la separación de almidón de trigo de un procedimiento de pasta a 40°C. En este ensayo se añade harina de trigo industrial (Cargill) a agua corriente precalentada (50°C) para crear una suspensión espesa de 35% de DS mezclando durante 1 minuto en una mezcladora de cocina (Braun). El pH de la suspensión se mantiene 'en el estado en el que está' a ~6,1. Se transfieren 100 gramos de esta suspensión al viscosímetro Haake VT550, calibrado a 40°C. Después de 1 minuto de incubación, la solución enzimática se añade a la suspensión espesa. Mientras tanto, el perfil de viscosidad se controla antes y después de añadir la enzima durante 15 minutos en total. Después de la incubación, se toman muestras por triplicado de la suspensión espesa incubada y una muestra de suspensión espesa t0 para una prueba de centrifugado. Cada muestra de prueba de centrifugado tiene un peso total de 22,5 g, que contiene 15,8-15,9 g de muestra de suspensión espesa añadida a 6,6-6,7 g de tubo de centrifuga desechable (15 ml). Todas las muestras se centrifugan en una centrífuga Hermle Z400 durante 15 minutos a 3500 rpm. Los valores de Brix se determinan a partir del jarabe de las muestras centrifugadas.

## Ejemplo 8

Clonación de una xilanas esqueleto (parental) de *Fusarium oxysporum* FoxXyn2

15 La secuencia de nucleótidos del gen *FoxXyn2* aislado de *Fusarium oxysporum* se describe como SEQ ID No. 30 (Figura 4A). La secuencia señal se muestra en negrita, y el intrón previsto se muestra en cursiva y minúsculas.

La secuencia de aminoácidos de la proteína de FoxXyn2 se describe como SEQ ID No. 29 (Figura 3A). La secuencia señal se muestra en cursiva.

20 La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína FoxXyn2 se describe como SEQ ID No. 31 o SEQ ID No. 4 (Figuras 3B y 3C).

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

## Ejemplo 9

Expresión de la proteína esqueleto (parental) de *FoxXyn2*

25 El gen *FoxXyn2* se amplificó a partir del ADN genómico de *Fusarium oxysporum* mediante el uso de los siguientes cebadores: Cebador 1 5'-ccgcgccgcaccATGAAGCTGTCTTCCTTCCTACACC-3' (SEQ ID No. 24) y cebador 2 5'-ccgcgccgcccttaTTAGCGGAGAGCGTTGACAACAG-3' (SEQ ID No. 25). Una vez digerido con *Not I* y *Asc I*, el producto de PCR se clonó en el vector de expresión pTrex3gM (descrito en el documento US 2011/0136197 A1) digerido con las mismas enzimas de restricción, y el plásmido resultante se marcó como pZZH135. Un mapa plasmídico de pZZH135 se proporciona en la Figura 18. La secuencia del gen *FoxXyn2* se confirmó por secuenciación de ADN.

30 El plásmido pZZH135 se transformó en una cepa de *Trichoderma reesei* con cuatro deleciones (descrita en el documento WO 05/001036) mediante el uso del método biolístico (ilustrado por Te'o VS *et al.*, en J Microbiol Methods, 51:393-9, 2002). La proteína aislada del sobrenadante de cultivo después de la filtración se utilizó para realizar un análisis de SDS-PAGE y el ensayo de actividad xilanas para confirmar la expresión de la enzima.

35 La secuencia de nucleótidos del gen *FoxXyn2* del plásmido de expresión pZZH135 se describe como SEQ ID No. 4. La secuencia de aminoácidos de la forma madura de la proteína FoxXyn2 se describe como SEQ ID No. 3.

La proteína FoxXyn2 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo mediante el uso de una resina para cromatografía de afinidad Blue Sepharose, 6FF, y las muestras se utilizaron para la caracterización bioquímica, como se describe en los ejemplos que siguen.

## 40 Ejemplo 10

Actividad xilanas de FoxXyn2 esqueleto (parental)

45 FoxXyn2 pertenece a la familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10, número CAZy). La actividad beta 1-4 xilanas de FoxXyn2 se determinó mediante el uso de xilano al 1% de madera de abedul (Sigma 95588) o arabinoxilano al 1% de harina de trigo (Megazyme P-WAXYM) como sustratos. En ensayo se llevó a cabo en citrato de sodio 50 mM, pH de 5,3, tampón Tween-80 al 0,005% a 50°C durante 10 minutos.

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

50

## Ejemplo 11

## Perfil de temperatura de FoxXyn2

La temperatura óptima de FoxXyn2 purificada se determinó por medio del ensayo de la actividad xilanasa a temperaturas que varían de 45°C a 94°C durante 10 minutos en tampón de citrato sódico 50 mM a pH 5,3. La actividad fue referida como actividad relativa, en donde la actividad a la temperatura óptima se fijó en 100%. El perfil de temperatura de FoxXyn2 se muestra en la Figura 19. Se determinó que FoxXyn2 tenía una temperatura óptima de 60°C y se determinó que retenía más de 50% de la actividad máxima entre 40°C y 65°C.

## Ejemplo 12

## Termoestabilidad

La termoestabilidad de FveXyn4 de tipo salvaje (wt) y variantes de FveXyn4 se determinó a 63°C (véanse los datos en la Tabla 2). Se muestra claramente que todas las variantes que representan números diferentes (2-4) y combinaciones de mutaciones tienen una actividad residual más alta a 63°C en comparación con FveXyn4 y puede concluirse que estas variantes son todas más termoestables que FveXyn4 de tipo salvaje (por ejemplo, que se muestra en la presente memoria como SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 27).

## 15 Materiales y métodos

Las variantes de FveXyn4 se obtuvieron a partir de genotecas combinatorias o por la introducción de mutaciones específicas como se describe en el Ejemplo 1. La termoestabilidad de las variantes de FveXyn4 se midió por la dilución y preincubación de las muestras enzimáticas en tampón MES 25 mM ( Tween 80 al 0,00125% – tampón MES 25 mM, pH 6,0, Tween 80 al 0,00125% (V:V)), pH 6,0 durante 10 min a 63°C. Después de la incubación se determinó la actividad residual por el método de determinación de la actividad xilanasa descrito en el Ejemplo 1. La actividad medida sin preincubación se fijó en 100%, y la actividad residual de cada variante a la temperatura respectiva se calculó con relación a esta.

La Tabla 2 muestra 14 variantes combinatorias de FveXyn4 con una termoestabilidad significativamente mayor en comparación con FveXyn4 wt. La termoestabilidad se mide como actividad residual después de la preincubación a 63°C durante 10 min como se describió anteriormente en la sección Materiales y métodos de este Ejemplo 12.

Variante	Mutaciones	Actividad residual
FveXyn4	Silvestre	0,04
1	K79F_A217Q_T298F	0,89
2	N7D_T33V_A217Q_T298F	0,80
3	N7D_K79F_T298F	0,79
4	T33V_K79F_A217Q	0,77
5	N7D_T33V_T298Y	0,76
6	T33V_A217Q_T298Y	0,67
7	N7D_A217Q_T298F	0,65
8	N7D_T33V_A217Q	0,60
9	K79F_T298F	0,59
10	N7D_K79F	0,58
11	T33V_K79F	0,57
12	T33V_T298Y	0,55
13	N7D_T33V	0,40
14	T33V_A217Q	0,35

## REIVINDICACIONES

1. Una enzima, en donde dicha enzima es una xilanasa GH10 o un fragmento de la misma, que tiene actividad xilanasa, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en dos o más de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F, o W o en donde la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 (mostrada en SEQ ID No. 1), en donde dicho fragmento tiene al menos 60% de la longitud de la enzima xilanasa GH10 de la cual deriva el fragmento, y en donde dicha enzima es:
- 5 a) una enzima xilanasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad, con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5; o
- 10 b) una enzima xilanasa codificada por una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad, con SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 31, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 32 o SEQ ID No. 33.
- 15 2. La enzima de la reivindicación 1, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en tres o más de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F o W, en donde la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1.
3. La enzima de la reivindicación 1, comprendiendo dicha enzima los siguientes aminoácidos en todas las posiciones indicadas: 7D, 33V; 79Y, V, F, I, L o M; 217Q, E, P, D o M; y 298Y, F o W, en donde la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1.
- 20 4. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enzima comprende adicionalmente al menos uno de los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:
- 25P;
- 57Q, T o V (preferiblemente, Q);
- 62T o S (preferiblemente, T);
- 25 64T o S (preferiblemente, T);
- 89G, N, Q, L o M (preferiblemente, G o Q, más preferiblemente, G);
- 103M o K (preferiblemente, M);
- 115E o L (preferiblemente, L);
- 147Q;
- 30 181Q, A, D o P (preferiblemente, Q);
- 193Y o N (preferiblemente, Y) y/o
- 219D o P (preferiblemente, P).
5. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la enzima comprende los siguientes aminoácidos en las posiciones indicadas:
- 35 i. 7D, 25P, 33V, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
- ii. 7D, 25P, 33V, 79Y, 89G, 217Q y 298Y.
- iii. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
- iv. 7D, 25P, 33V, 57Q, 62T, 79Y, 89G, 103M, 115L, 147Q, 181Q, 193Y, 217Q, 219P y 298Y;
- v. 7D, 33V, 57Q, 62T, 64T, 79Y, 89G, 217Q y 298Y;
- 40 vi. 79F\_217Q\_ y 298F;
- vii. 7D\_33V\_217Q\_ y 298F;
- viii. 7D\_79F\_ y 298F;
- ix. 33V\_79F\_ y 217Q;

- x. 7D\_33V\_ y 298Y;
- xi. 33V\_217Q\_ y 298Y;
- xii. 7D\_217Q y \_298F;
- xiii. 7D\_33V\_ y 217Q;
- 5 xiv. 79F y \_298F;
- xv. 7D\_ y 79F;
- xvi. 33V\_ y 79F;
- xvii. 33V\_ y 298Y;
- xviii. 7D\_ y 33V; o
- 10 xix. 33V\_ y 217Q.
6. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha enzima comprende un polipéptido que tiene al menos 94% de identidad con SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29 o SEQ ID No. 5.
7. La enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha enzima a) comprende una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la presente memoria como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21, o b) comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 96%, preferiblemente al menos 98,5%, idéntica a las secuencias de aminoácidos mostradas en la presente memoria como SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21, siempre que los aminoácidos en las posiciones 7, 33, 79, 217 y 298 sean idénticos a los mostrados en SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 19, SEQ ID No. 20 o SEQ ID No. 21.
8. Una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica la de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un vector que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 8.
10. Una construcción recombinante que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 8.
11. Una célula anfitriona que comprende el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 8.
- 25 12. La célula anfitriona de la reivindicación 11, en donde la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula fúngica, una célula de levadura, una célula fúngica filamentosa y una célula vegetal.
13. Un método para mejorar la termoestabilidad de una xilanasa GH10, que comprende: modificar una xilanasa GH10 parental para que comprenda los siguientes aminoácidos en dos o más de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente 79Y, F o V, más preferiblemente Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente 217Q, E o P, más preferiblemente Q); y 298Y, F o W (preferiblemente Y o F, más preferiblemente Y), en donde la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1.
- 30 14. Un método de la reivindicación 13, que comprende modificar las xilanasa GH10 parental en al menos tres de las posiciones indicadas: 7D; 33V; 79Y, V, F, I, L o M (preferiblemente 79Y, F o V, más preferiblemente Y); 217Q, E, P, D o M (preferiblemente 217Q, E o P, más preferiblemente Q); y 298Y, F o W (preferiblemente Y o F, más preferiblemente Y), en donde la numeración corresponde a la numeración de la secuencia de aminoácidos de FveXyn4 mostrada en SEQ ID No. 1.
- 35 15. Una composición de enzima o una composición de aditivo para pienso que comprenden la enzima de las reivindicaciones 1-7.
16. Una premezcla que comprende una enzima xilanasa GH10 de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o la composición de enzima o la composición de aditivo para pienso de la reivindicación 15, y al menos una vitamina y/o al menos un mineral.
- 40 17. La composición de aditivo para pienso de la reivindicación 15 o la premezcla de la reivindicación 16, que comprenden, adicionalmente, 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  $\alpha$ -amilasas (E.C. 3.2.1.1), amilasas formadoras de G4 (E.C. 3.2.1.60),  $\beta$ -amilasas (E.C. 3.2.1.2) y  $\gamma$ -amilasas (E.C. 3.2.1.3) y/o una fitasa (por ejemplo, una 6-fitasa (E.C.3.1.3.26) o una 3-fitasa (E.C. 3.1.38)).
- 45

18. Un pienso (o alimento para animales) que comprende dicha enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la composición de enzima o la composición de aditivo para pienso de la reivindicación 15.
19. El uso de dicha enzima de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o la composición de enzima o la composición de aditivo para pienso de la reivindicación 15 para degradar arabinoxilano a un material que contiene xilano.
- 5 20. El uso de la reivindicación 19, en donde el material que contiene xilano se selecciona entre uno o más del grupo que consiste en: un pienso o alimento para animales; un componente para pienso; un material a base de grano; un producto macerado; un mosto; una malta; cebada malteada; un agente adicional, un producto macerado de cebada; y una harina de cereal.
- 10 21. El uso de la reivindicación 20, en donde dicha enzima xilanasa se utiliza combinada con una o más de las enzimas seleccionadas entre endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4); celobiohidrolasas (E.C. 3.2.1.91),  $\beta$ -glucosidasas (E.C. 3.2.1.21), celulasas (E.C. 3.2.1.74), liquenasas (E.C. 3.1.1.73), lipasas (E.C. 3.1.1.3), acetiltransferasas lipídicas (clasificadas, generalmente, como E.C. 2.3.1.x), fosfolipasas (E.C. 3.1.1.4, E.C. 3.1.1.32 o E.C. 3.1.1.5), fitasas (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. 3.1.1.72, E.C. 3.1.1.73), 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 mananasas (por ejemplo, una  $\beta$ -mananasa (E.C. 3.2.1.78)).
- 15

FIGURA 1A

(SEQ ID No. 26)

mklsflytaslvaa**IPTAIEPRQAADS**SINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN  
SGKWDATEPSQGFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK  
VIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADP  
NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL  
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN  
YNPKPAYTAVNALR

FIGURA 1B

(SEQ ID No: 27)

**IPTAIEPRQAADS**SINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP  
SQGFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQV  
GRYKGKIYAWDVVNEIFEWGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDY  
LDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAI  
TELDIRTAPANDYATVTKACLNVPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPAYTAV  
VNALR

FIGURA 1C

(SEQ ID No: 1)

QAADSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGFNFGSFDQVVNFAQQ  
NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGKIYAWDVVNEIFEWGTLRKDSHFNNVFG  
NDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGAL  
TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPAYTAV  
VNALR

FIGURA 2A  
(SEQ ID No: 24)

**ATGAAGCTGTCTTCTTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA**  
TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC  
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCC  
AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA  
GTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA  
CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG**gtatgttttattccccagacttctt**  
**cgaaatgactttgctaacatgttcag**GACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCC  
GAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTC  
CGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCG  
ACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCT  
CAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC  
GCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTG  
CCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAA  
GGCCTGCCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAG  
AACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCC  
TGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 2B

(SEQ ID No: 25)

**ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA  
TCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATC  
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
GAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCAACTTTGCC  
AGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCA  
GTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCA  
CCCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGAT  
CTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAAC  
GACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGC  
TGACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTAT  
GGTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCT  
CAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCG  
CCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGC  
CAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCA  
CCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGTT  
CGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA**

FIGURA 2C

**(SEQ ID NO. 2)**

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCTGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC  
TACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCC  
GTTACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGAC  
CAGGTTGTCAACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCT  
CAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGAC  
TCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCCTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCC  
AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCC  
TCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC  
GCTGGCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAATCTGGTGTCAAGGAGGTGCCATCACCGAGCTCGAC  
ATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATC  
ACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCAGCAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAAC  
CCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 3A

(SEQ ID No. 28)

mklssflytaslvaa***IPTAIEPR***QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPEN  
SGKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTK  
VIENHVTVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADP  
NAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTAL  
ANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDAN  
YNPKAAYTAVNALR

FIGURA 3B

(SEQ ID No: 29)

***IPTAIEPR***QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEP  
SQGKFNFGSFDQVVNFAQQNGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTVV  
GRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFGNDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDYS  
LDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGALTALANSGVKEVAI  
TELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAV  
VNALR

FIGURA 3C

(SEQ ID No: 3)

QASDSINKLIKNGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAIKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGKFNFGSFDQVVNFAQQ  
NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTVVGRYKGKIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFG  
NDDYVGIASFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQTHLDPGAAGQIQGAL  
TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDANYNPKAAYTAV  
VNALR

## FIGURA 4A

(SEQ ID No: 30)

**ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA**  
TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC  
ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG  
AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTAACCTTTGCTCA  
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCAGCTCCCTCAG  
TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCAC  
CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG*gtatgtttcttcaactgaactcttat*  
*aaatggcttfactaacatgttcag*GACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGA  
AAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCG  
CGCTGCCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGAC  
TCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCA  
GCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCCGC  
TGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACCTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCC  
ATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGG  
CCTGCCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAAC  
TCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGGCTG  
CTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 4B

(SEQ ID No: 31)

**ATGAAGCTGTCTTCCTTCCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA  
TCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATC  
ATCAAGGCTGACTTTGGCGCCGTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCG  
AGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCTCA  
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCTCAG  
TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTAC  
CAACGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTTAACGAGATC  
TTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGA  
CGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG  
TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG  
TTCCCTCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCA  
GACTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC  
AACTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCA  
ACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCAAGTGCATTGGTATCACC  
GTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTCCG  
ATGCTAACTACAACCCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA**

## FIGURA 4C

(SEQ ID No. 4)

ATTCACCCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCTCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC  
TACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACTGCCATCATCAAGGCTGACTTTGGCGCC  
GTCACACCCGAGAACTCGGGTAAGTGGGATGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGCAGCTTCGAC  
CAGGTCGTCAACTTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTAGTCTGGCACTCCCAGCTCCCT  
CAGTGGGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTACTTTGACCAAGGTCATCGAGAACCACGTCACCAACGTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTTAACGAGATCTTCGACTGGGATGGTACCCTCCGAAAGGAC  
TCTCACTTCAACAACGCTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCTGCCCGCAAGGCTGACCCC  
AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTTCCC  
TCTGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTCCCCGTCGACGGTATTGGTTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTGCC  
GCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACCTCTGGTGTGAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGAC  
ATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTTACCAAGGCCTGCCCAACGTCACCAAGTGCATTGGTATC  
ACCGTCTGGGGCGTATCTGACAAGAACTCTTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTTCGATGCTAACTACAAC  
CCCAAGGCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 5

(SEQ ID No: 5)

QAADSINKLIKKNKGKLYYGTITDPNLLGVAKDTAVIKADFGAVTPENSGKWDATPEPSQGNFNFGSFDQVVNFQQ  
 NGLKVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKATLTKVIENHVTQVVGRYKGIYAWDVVNEIFDWDGTLRKDSHFNNVFG  
 NDDYVGI AFRAARKADPNKLYINDYSLDSASASKVTKGMVPSVKKWLSQGV PVDGIGSQSHLDPGAAGQVQ GAL  
 TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRKEHDSLLFDSNYNPKPAYTAV  
 VNALR

FIGURA 6A

(SEQ ID No: 32)

**ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA**  
 TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
 CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTC  
 ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
 GAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTCTCAACTTTGCTCA  
 GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG  
 TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCAC  
 CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGG**gtatgtttcttgacctcagcttctca**  
**aagatgaatttgctaacatgttcag**GACGTGTCAACGAGATCTTCGACTGGGACGGTACCCTCCG  
 AAAGGATCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCC  
 GCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGA  
 CTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTC  
 AGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCAGICTCACCTTGACCCCGGTGCCG  
 CTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGC  
 CATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCCACCGTCACCAAG  
 GCCTGCCTAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAA  
 CTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTGACTCCA ACTACAACCCCAAGCCT  
 GCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

## FIGURA 6B

(SEQ ID No: 33)

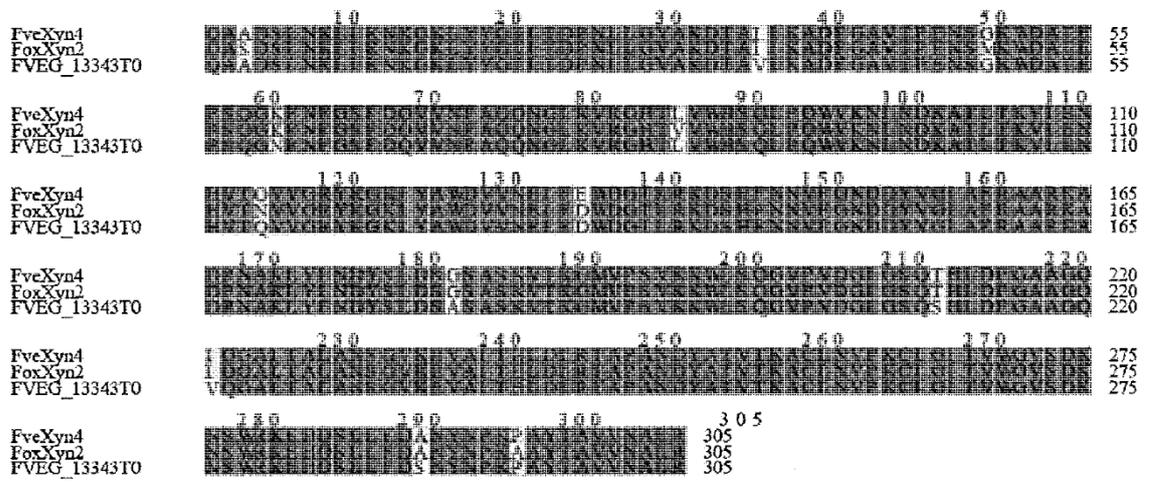
**ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCA  
TCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCT  
CTACTACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTC  
ATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTCACCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACC  
GAGCCCAGCCAGGGCAACTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTCGTCAACTTTGCICA  
GCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAG  
TGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCAC  
CCAAGTCGTTGGACGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTIGTCAACGAGATC  
TTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGATTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGA  
IGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAAGCTG  
TACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGG  
TCCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCCA  
GICTCACCTTGACCCCGGTGCCGCTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCC  
AACTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCA  
ACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCAC  
CGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCTTCTGTT  
GACTCCAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA**

## FIGURA 6C

(SEQ ID No: 6)

ATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCCAGGCCGCCGACAGCATCAACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTAC  
TACGGAACCATCACCGACCCCAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACACCGCCGTCATCAAGGCCGACTTTGGCGCC  
GTCACCCCCGAGAACTCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCACTTCAACTTCGGTAGCTTCGAC  
CAGGTCTCAACTTTGCTCAGCAGAATGGCCTCAAGGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCT  
CAGTGGGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCAACGAGATCTTCGACTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGAT  
TCTCACTTCAACAACGCTCTTCGGCAACGATGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCC  
AACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGCCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGCATGGTCCC  
TCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCCAGTCTCACCTTGACCCCGGTGCC  
GCTGGCCAAGTCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAACCTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGAC  
ATCCGCACTGCCCCCGCAACGACTACGCCACCGTCACCAAGGCCTGCCTAAACGTCACCAAGTGCATTGGTATC  
ACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGCCTTCTGTTTCGACTCCAACTACAAC  
CCCAAGCCTGCTTACACTGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

FIGURA 7



## FIGURA 8

**(SEQ ID No: 7)**

>Secuencia codificante de la variante de la enzima A (1 bp-987 bp, directo) 987 bp  
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA  
 AGGACTCTCACTTCAACCAGGCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCGCGCCGCCCGCAA  
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACC  
 AAGGGTATGGTTCCCTACGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA  
 CTCACCTTGACCCCGGTCAGGCTCCCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA  
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC  
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
 AGCACGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT  
 CCGCTAA

**(SEQ ID No: 8)**

>Secuencia codificante de la variante de la enzima B (1 bp-987 bp, directo) 987 bp  
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACCTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA  
 AGGACTCTCACTTCAACCAGGCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCGCGCCGCCCGCAA  
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACC  
 AAGGGTATGGTTCCCTACGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA  
 CTCACCTTGACCCCGGTCAGGCTCCCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA  
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC  
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
 AGCACGACAGTCTTCTGTTCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT  
 CCGCTAA

**FIGURA 8 Continuación****(SEQ ID No: 9)**

>Secuencia codificante de la variante de la enzima C (1 bp-987 bp, directo) 987 bp  
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
 CCCTCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA  
 AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAA  
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC  
 AAGGGTATGGTTCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA  
 CTCACCTTGACCCCGGTGAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA  
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC  
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
 AGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT  
 CCGCTAA

**(SEQ ID No: 10)**

>Secuencia codificante de la variante de la enzima D (1 bp-987 bp, directo) 987 bp  
 ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
 CAACCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTGCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGACGTGTCACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA  
 AGGACTCTCACTTCAACAACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAA  
 GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC  
 AAGGGTATGGTTCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA  
 CTCACCTTGACCCCGGTGAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGCTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAA  
 GGAGGTTGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC  
 TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
 AGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT  
 CCGCTAA

## FIGURA 8 Continuación

(SEQ ID No: 11)

>Secuencia codificante de la variante de la enzima E (directo) 987 bp  
ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CCCC'FGCTCGGGCTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCACCAGCTTCGACCAGGTGTGTC  
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCGGAGGTCACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCC'FGGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAA  
AGGACTCTCACTTCAACAACGTCCTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAA  
GGCTGACCCCAACGCCAAGCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACC  
AAGGGTATGGTTCCCTCCGTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGA  
CTCACCTTGACCCCGGTCAGGCTGGCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAATCTGGTGTCAA  
GGAGGTGGCCATCACCGAGCTCGACATCCGCACTGCCCCGCCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCC  
TGCCTCAACGTCCCCAAGTGCAATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGG  
AGCACGACAGTCTTCTGTTGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCT  
CCGCTAA

## FIGURA 9

## (SEQ ID No: 12)

>Variante de la enzima A (121 bp-1159 bp, directo) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCGGTAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA  
CATGTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACC  
 AGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA  
 GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC  
 GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
 AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA  
 GCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG  
 TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT  
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

## (SEQ ID No: 13)

>Variante de la enzima B (121 bp-1159 bp, directo) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
 AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
 CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
 TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCCAGCAGGGCAAGTTCACCTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
 ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACTCTCAGCTCCCTCAGTG  
 GGTAAAGAACATCAACGACAAGGCTATGCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAACTCGTTGGA  
 CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCCTGGGTATGTTTTATTCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA  
CATGTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACC  
 AGGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA  
 GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCCAGAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTAC  
 GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
 AGGCTCCCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA  
 GCTCGACATCCGCACTGCCCCCGCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCCAAG  
 TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT  
 TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA



**FIGURA 9 Continuación**

**(SEQ ID No: 16)**

>Variante de la enzima E (46 bp-1084 bp, directo) 1039 bp

ATGAAGCTGTCTTCTTTCTTCTACACCGCCTCGCTGGTCGCGGCCATTCCCACCGCCATCGAGCCCCGCC  
AGGCTGCCGACAGCATCGACAAGCTGATCAAGAACAAGGGCAAGCTCTACTACGGAACCATCACCGACCC  
CCCCCTGCTCGGCGTCGCAAAGGACGTCGCCATCATCAAGGCCGACTTTGGCGCCGTTACCCCCGAGAAC  
TCGGGCAAGTGGGACGCCACCGAGCCCAGCCAGGGCAAGTTCAACTTCACCAGCTTCGACCAGGTTGTCA  
ACTTTGCCCAGCAGAATGGCCTCTACGTCCGAGGTCACACTCTGGTCTGGCACGGCCAGCTCCCTCAGTG  
GGTTAAGAACATCAACGACAAGGCTACTCTGACCAAGGTCATTGAGAACCACGTCACCCAAGTCGTTGGA  
CGCTACAAGGGCAAGATCTACGCC'GGGTATGTTTTATTCCCCCAGACTTCTTCGAAATGACTTTGCTAA  
CATGTTCAGGACGTCGTCAACGAGATCTTCGAGTGGGACGGTACCCTCCGAAAGGACTCTCACTTCAACA  
ACGTCTTCGGCAACGACGACTACGTTGGCATTGCCTTCCGCGCCGCCCGCAAGGCTGACCCCAACGCCAA  
GCTGTACATCAACGACTACAGCCTCGACTCCGGCAGCGCCTCCAAGGTCACCAAGGGTATGGTTCCCTCC  
GTCAAGAAGTGGCTCAGCCAGGGCGTTCCCGTCGACGGCATTGGCTCTCAGACTCACCTTGACCCCGGTC  
AGGCTGGCCAAATCCAGGGTGTCTCACTGCCCTCGCCAATTCTGGTGTCAAGGAGGTTGCCATCACCGA  
GCTCGACATCCGCAC'TGCCCCGCAACGACTACGCTACCGTCACCAAGGCCTGCCTCAACGTCCCAAG  
TGCATTGGTATCACCGTCTGGGGTGTCTCTGACAAGAACTCTTGGCGCAAGGAGCACGACAGTCTTCTGT  
TCGATGCTAACTACAACCCCAAGCCTGCTTACTACGCTGTTGTCAACGCTCTCCGCTAA

**FIGURA 10****(SEQ ID No: 17)**

&gt;Variante de la enzima A madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKGLYYGTITDPPLLGVAKDVAI IKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFGSFDQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKAMLTQVIENHVTQLVGRYKGGKIYAWDVVNEI FEWDGTLR  
 KDSHFNQVFGNDDYVGI AFRAARKADPNAKLYINDYSLDSQSASKVTKGMVPYVKKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQAPQIQGAL TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**(SEQ ID No: 18)**

&gt;Variante de la enzima B madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKGLYYGTITDPPLLGVAKDVAI IKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFTSFDQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHSQLPQWVKNINDKAMLTQVIENHVTQLVGRYKGGKIYAWDVVNEI FEWDGTLR  
 KDSHFNQVFGNDDYVGI AFRAARKADPNAKLYINDYSLDSQSASKVTKGMVPYVKKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQAPQIQGAL TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**(SEQ ID No: 19)**

&gt;Variante de la enzima C madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKGLYYGTITDPPLLGVAKDVAI IKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGFNFGSFDQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTQVIENHVTQVVGRYKGGKIYAWDVVNEI FEWDGTLR  
 KDSHFNNVFGNDDYVGI AFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQACQIQGAL TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**(SEQ ID No: 20)**

&gt;Variante de la enzima D madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKGLYYGTITDPNLLGVAKDVAI IKADFGAVTPENSGKWDATEPQQGKFTFTSFDQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTQVIENHVTQVVGRYKGGKIYAWDVVNEI FEWDGTLR  
 KDSHFNNVFGNDDYVGI AFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQACQIQGAL TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

**(SEQ ID No: 21)**

&gt;Variante de la enzima E madura 306 aa

QAADSIDKLIKNGKGLYYGTITDPPLLGVAKDVAI IKADFGAVTPENSGKWDATEPSQGFNFSTFDQVV  
 NFAQQNGLYVRGHTLVWHGQLPQWVKNINDKATLTQVIENHVTQVVGRYKGGKIYAWDVVNEI FEWDGTLR  
 KDSHFNNVFGNDDYVGI AFRAARKADPNAKLYINDYSLDSGSASKVTKGMVPSVKKWLSQGVPVDGIGSQ  
 THLDPGQACQIQGAL TALANSGVKEVAITELDIRTAPANDYATVTKACLNVKPCIGITVWGVSDKNSWRK  
 EHDSLLFDANYNPKPAYYAVVNALR\*

FIGURA 11

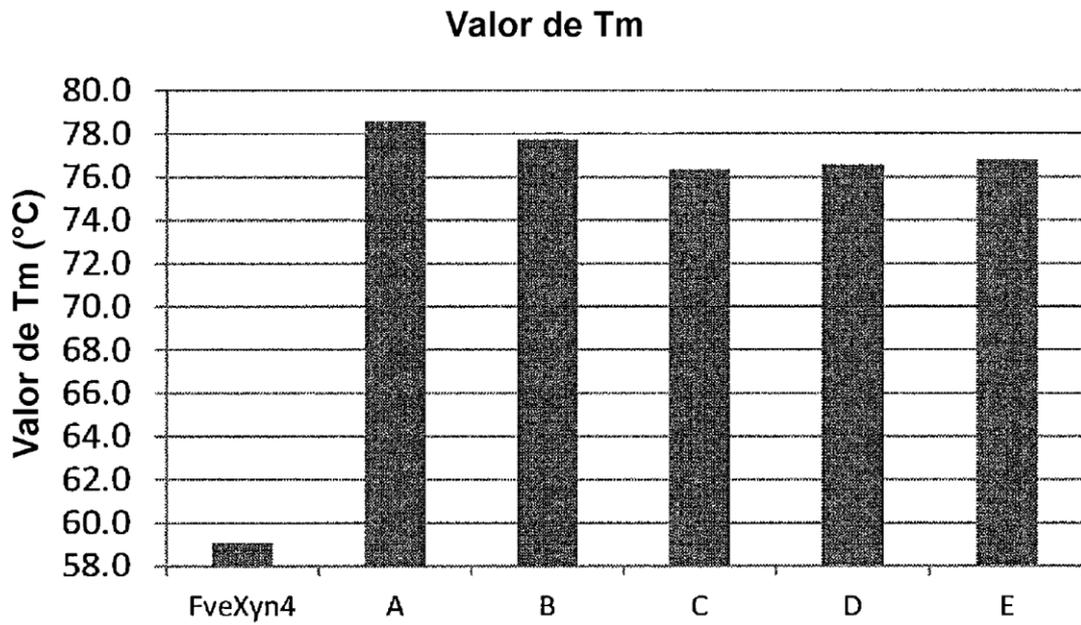


FIGURA 12

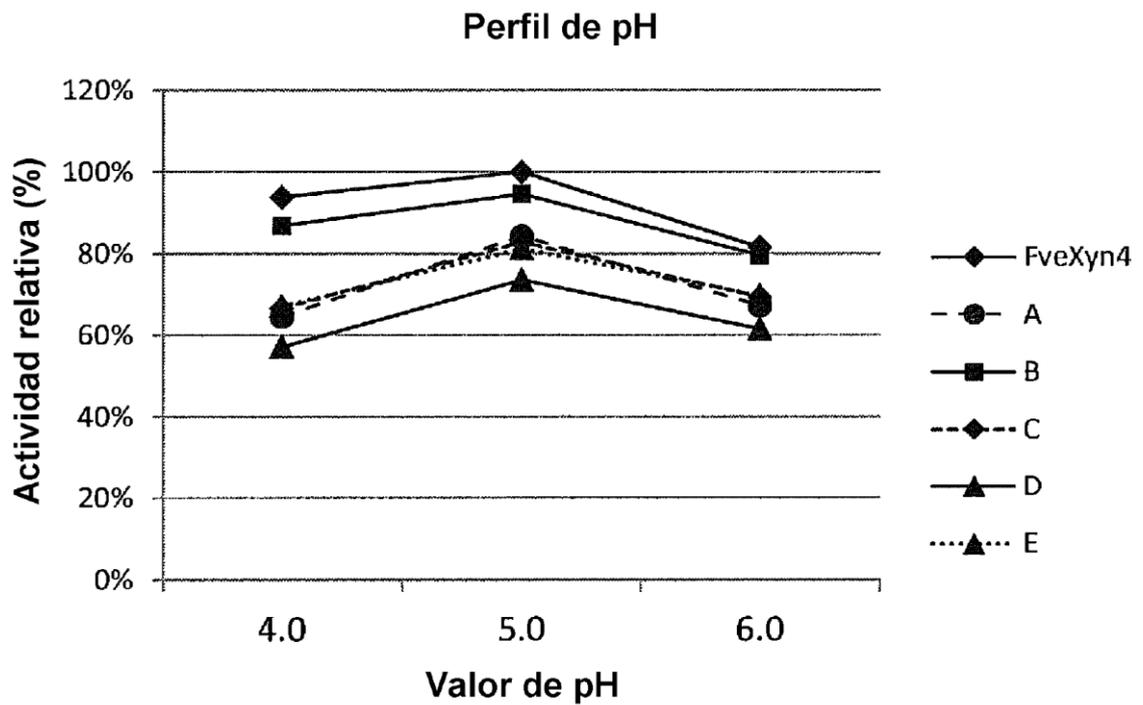


FIGURA 13a

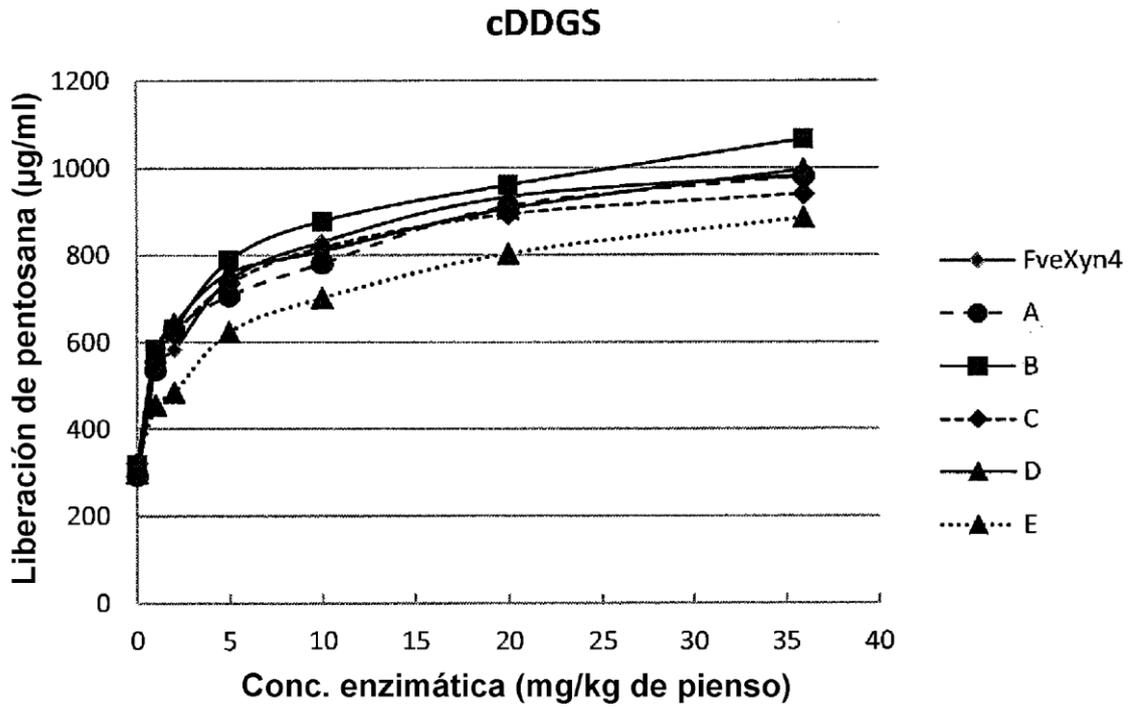


FIGURA 13b

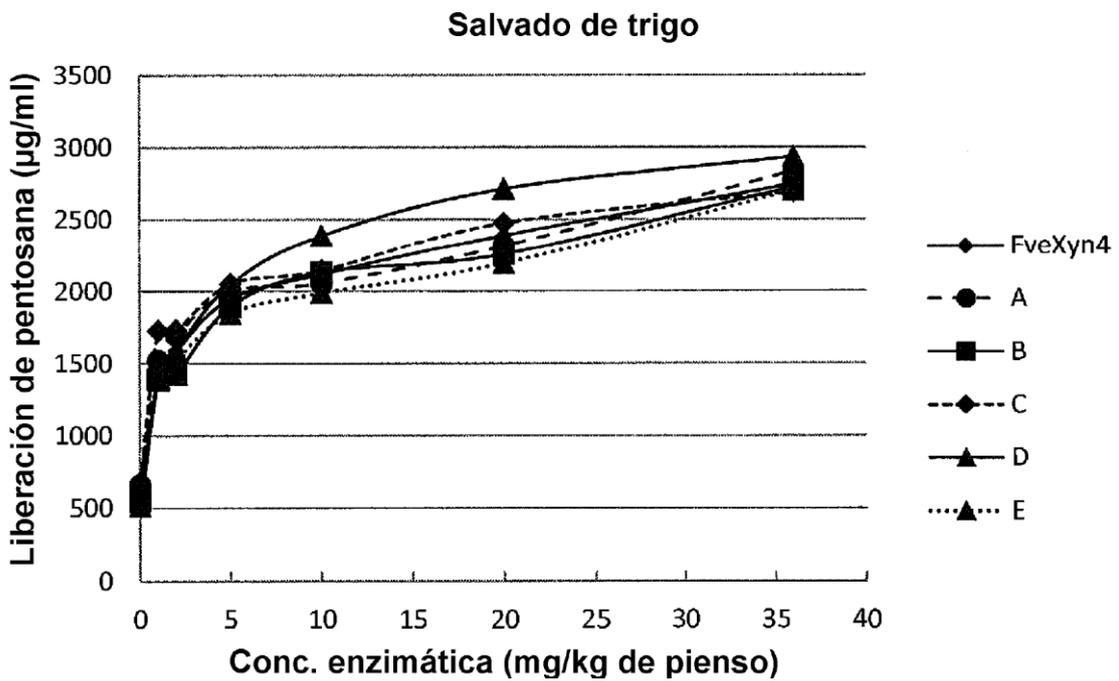


FIGURA 14

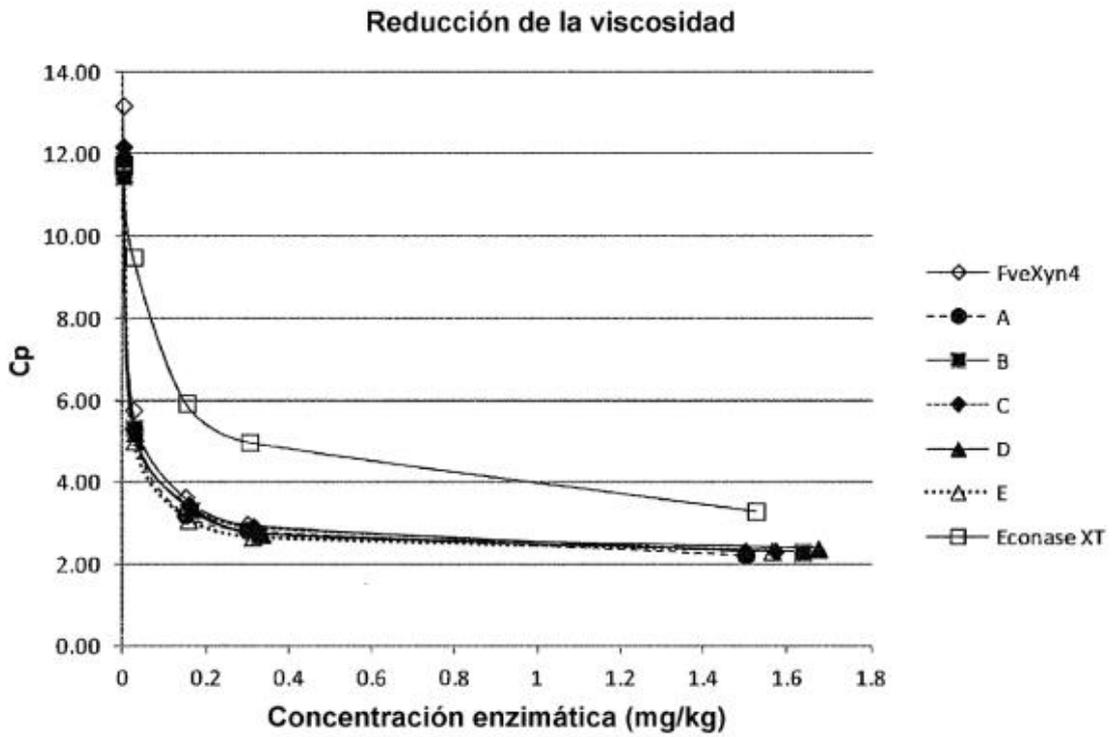


FIGURA 15

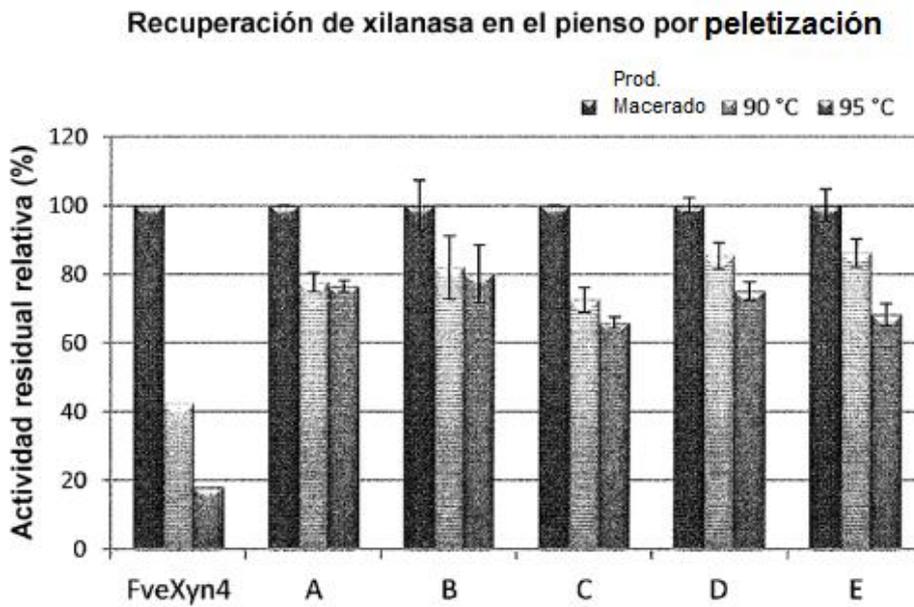


FIGURA 16

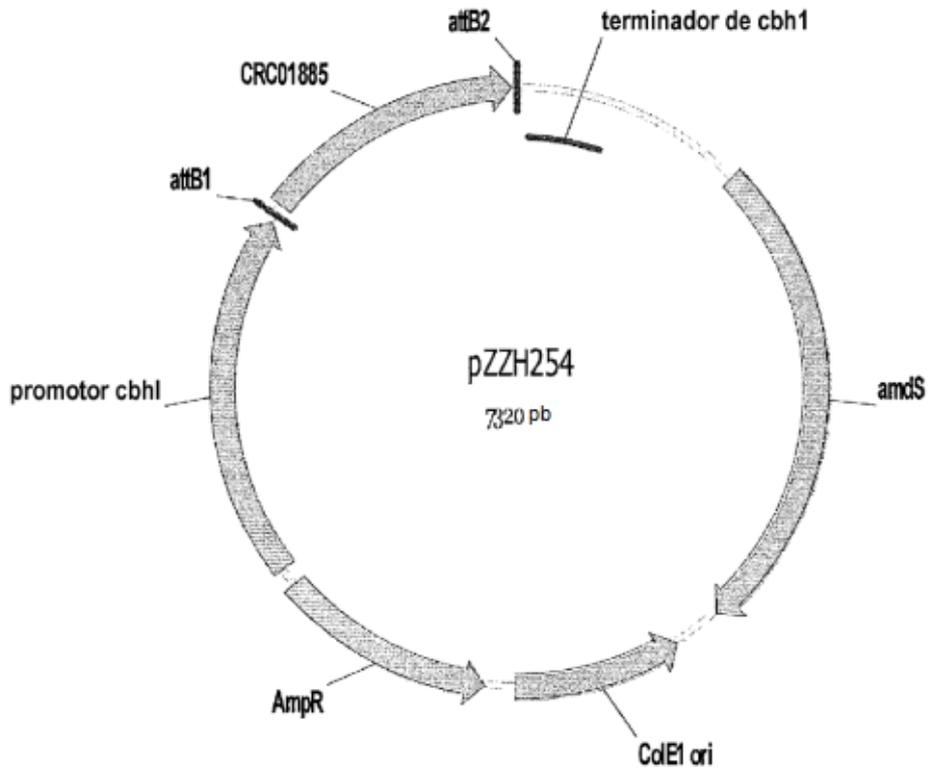


FIGURA 17

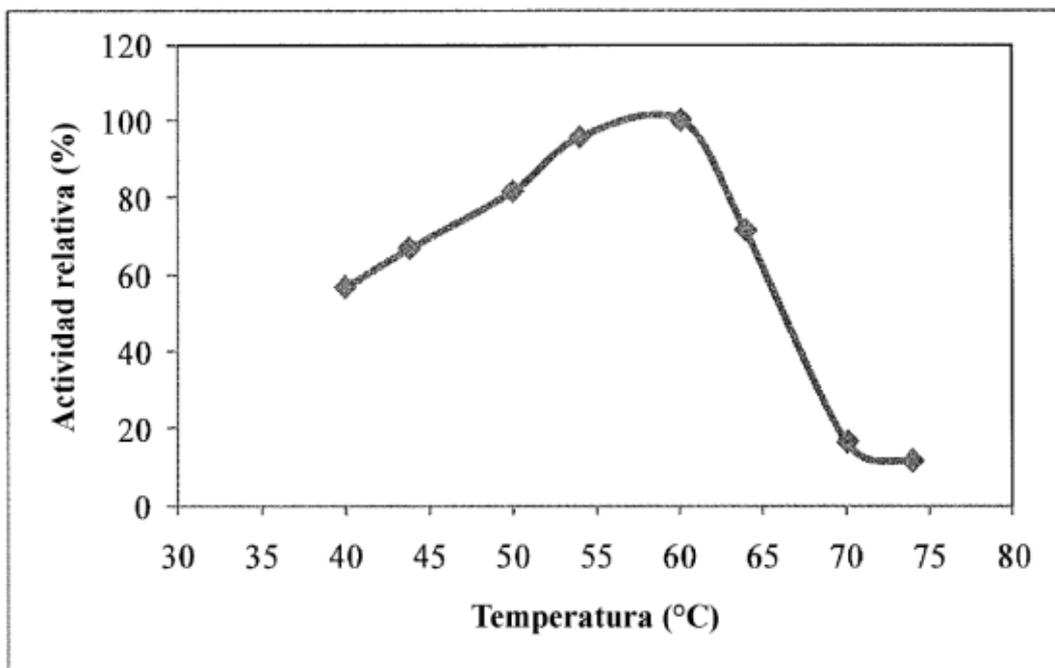


FIGURA 18

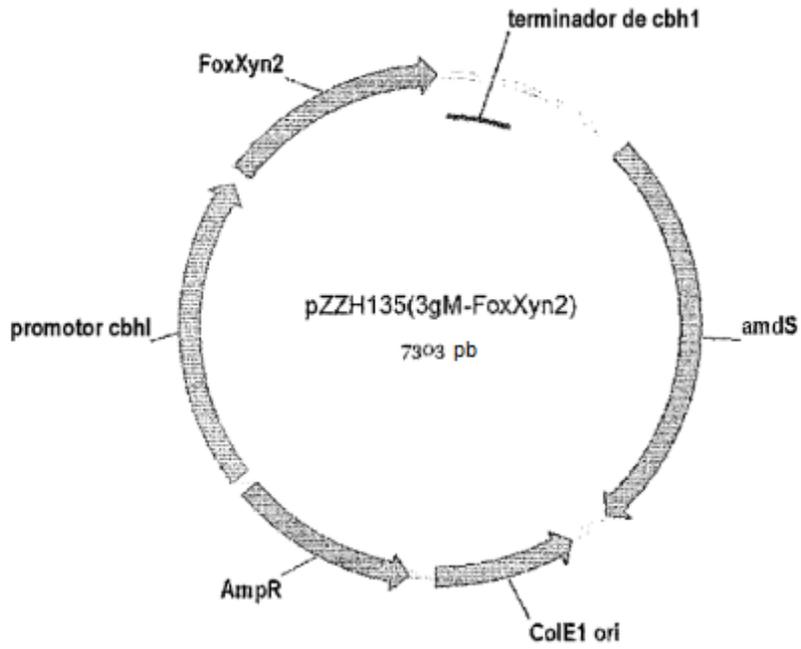


FIGURA 19

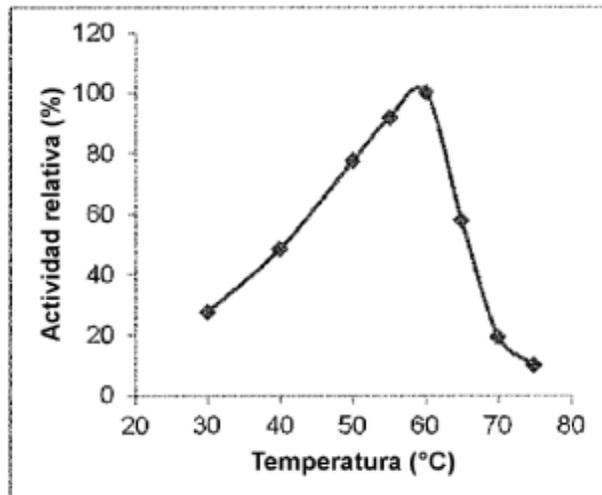


FIGURA 20

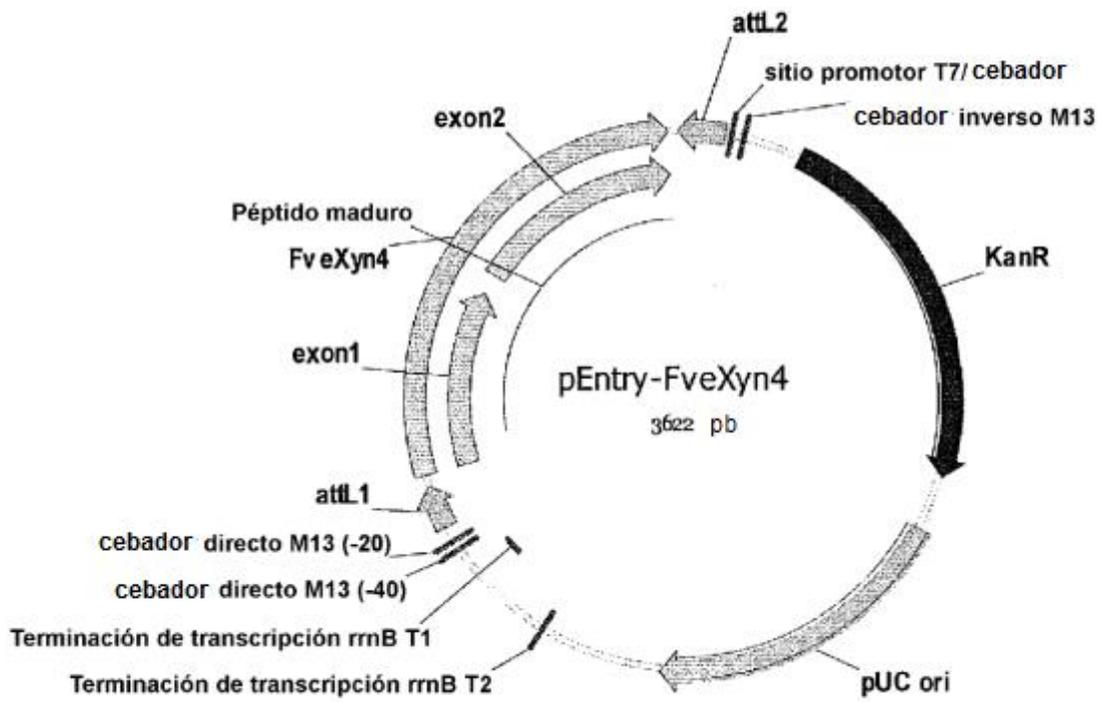


FIGURA 21

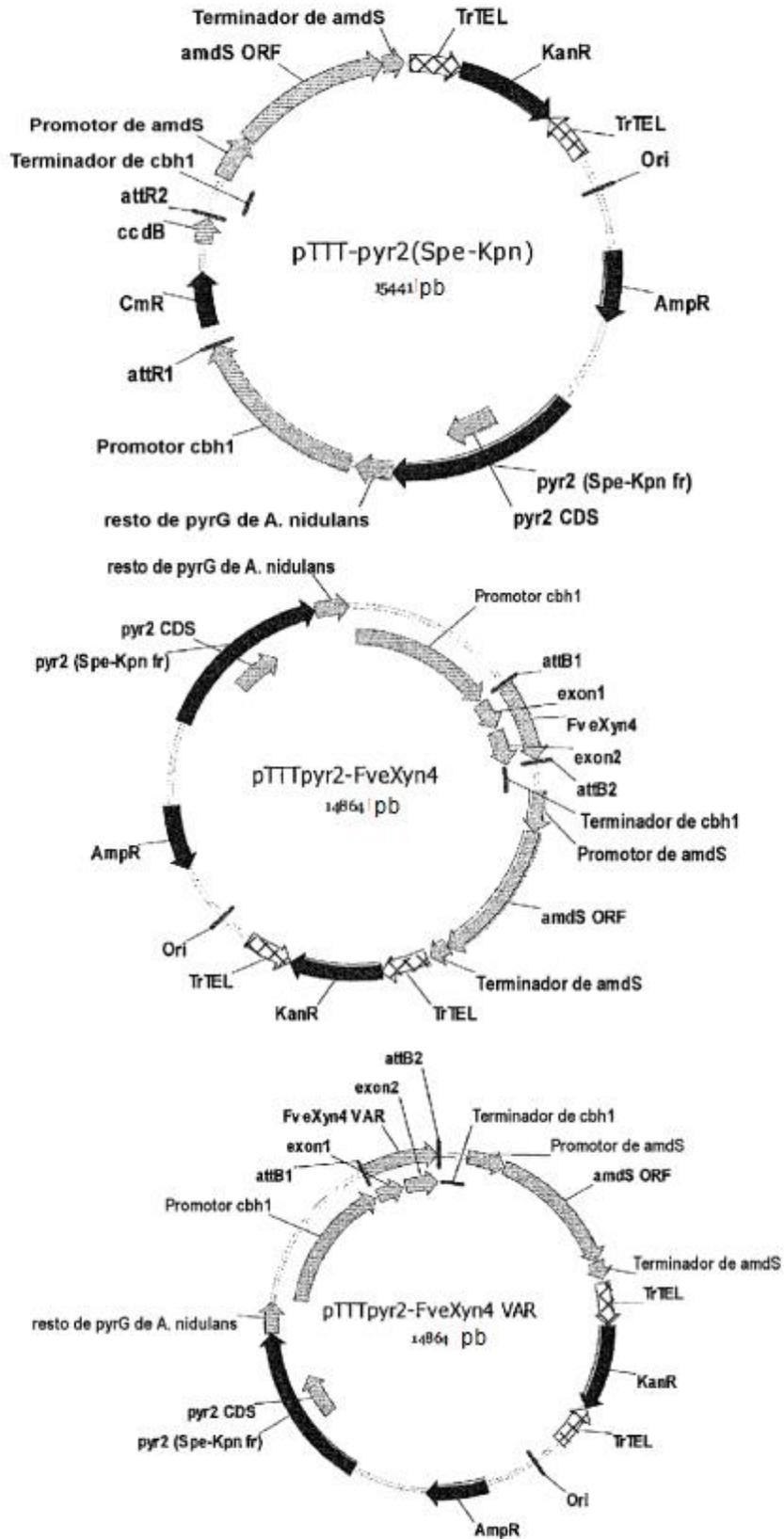


FIGURA 22

