

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 326**

51 Int. Cl.:

A23K 1/06 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

A23L 1/015 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08865475 .1**

96 Fecha de presentación: **18.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2244590**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2010**

54 Título: **Cutinasa para detoxificación de productos alimenticios para animales**

30 Prioridad:
20.12.2007 EP 07150205

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.08.2012

73 Titular/es:
**Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:
**VIKSOE-NIELSEN, Anders y
SOERENSEN, Birthe Hauerbach**

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

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).

ES 2 386 326 T3

DESCRIPCIÓN

Cutinasa para detoxificación de productos alimenticios para animales.

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en forma informática legible. La forma informática legible es incorporada aquí por referencia.

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a un método comprendiendo tratamiento con cutinasa para detoxificación de productos alimenticios para animales contaminados por la micotoxina zearalenona.

15 Antecedentes de la invención

[0003] Diferentes plantas patógenas y/o especies de *Fusarium* de poscosecha en cereales producen sustancias tóxicas de interés considerable para productores de ganado y de aves de corral, por ejemplo, deoxinivalenol, toxina T-2, toxina HT-2, diacetoxiscirpenol y zearalenona.

20 [0004] Zearalenona se encuentra a nivel mundial en un número de brotes de cereal, tales como maíz, cebada, avena, trigo, centeno, arroz, mijo y sorgo. Producción de zearalenona no parece ocurrir en cantidades significativas antes de cosecha, pero bajo condiciones medioambientales apropiadas, son producidos fácilmente en maíz y granos pequeños en almacenamiento.

25 [0005] Cuando el grano de cereal se usa en la producción de etanol y el almidón se consume, la zearalenona se concentra en los subproductos de fermentación, por ejemplo, en el grano seco de destilería. El contenido de zearalenona en los productos derivados de fermentación puede aumentarse tres veces en relación al grano de cereal.

30 [0006] La toxina es termoestable y no se destruye por almacenamiento largo, tostado, o por la adición de ácido propiónico o retardadores de molde.

35 [0007] A pesar de su diferencia estructural con respecto los estrógenos esteroidales, zearalenona y diferentes derivados poseen actividad estrogénica. Zearalenona sufre un pliegue de manera que hidróxilo o grupos hidróxilo potenciales se orientan apropiadamente para facilitar unión a receptores de tejido que normalmente unen estrógenos.

40 [0008] La zearalenona es la toxina primaria que causa infertilidad, aborto u otros problemas de cría, especialmente en el ganado porcino. Los síntomas son especialmente graves en cerdas jóvenes prepuberales, incluyendo agrandamiento de mamas, hinchamiento de útero y vulva y atrofia de los ovarios. En casos graves, prolapso de la vulva y recto puede ocurrir. Jabalíes muestran mamas aumentadas y testículos atrofiados.

45 [0009] La zearalenona está presente en la carne de animales alimentados con grano contaminado al igual que en el pan horneado de trigo contaminado. Aunque casos de envenenamiento en seres humanos son raros, hay interés sobre el efecto de la exposición a largo plazo de seres humanos a tal actividad estrogénica.

50 [0010] Inactivación de micotoxinas, incluyendo zearalenona, usando epoxidasa o lactonasa se describe en la W09612414.

[0011] Hay una necesidad para además métodos de detoxificación de productos alimenticios para animales, por ejemplo, tal como productos de fermentación, incluyendo grano mojado y seco de destiladores, contaminados por la micotoxina zearalenona.

55 Resumen de la invención

60 [0012] Los inventores de la presente invención han descubierto que zearalenona en un producto alimenticio para animales se puede degradar tratando el producto de alimento con una cutinasa. Por consiguiente, en un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para degradar zearalenona en un producto alimenticio para animales, este proceso comprende tratamiento de dicho producto alimenticio para animales con una cutinasa.

[0013] En un segundo aspecto, la invención proporciona un uso de una cutinasa para la degradación de la micotoxina zearalenona.

Descripción detallada de la invención

Zearalenona

- 5 [0014] En el contexto de esta invención el término "zearalenona" comprende la micotoxina zearalenona producida de cierta sp. de *Fusarium*. El nombre de la IUPAC es (4S,12E)-15, 17-dihidroxi-4-metil-3-oxabicyclo[12.4.0]octadeca-12, 15, 17, 19-tetraeno-2, 8-diona. El término "zearalenona" también comprende cualquier derivado de zearalenona que comprende un enlace interno éster carboxílico susceptible de modificación por una cutinasa.

Productos alimenticios para animales

- 10 [0015] El término "animal" incluye todos los animales, incluyendo seres humanos. Ejemplos de animales son ganado bovino, (incluyendo, pero no limitado a, vacas y terneros); animales monogástricos, por ejemplo, cerdos o puercos (incluyendo, pero no limitado a, lechones, cerdos en crecimiento y
- 15 ponedoras); y pescado (incluyendo, pero no limitado a, salmón).
- [0016] El término "alimento" o "producto alimenticio para animales" significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinado para, toma por un animal.
- 20 [0017] El producto alimenticio para animales puede ser un producto que aparte de un nivel indeseado de zearalenona es conveniente para consumo por un animal. El producto alimenticio para animales puede también ser un producto que se sospecha que comprende un nivel indeseado de zearalenona, y/o un producto con un nivel desconocido de zearalenona, incluyendo productos que no comprenden un nivel detectable de zearalenona.

- 25 [0018] Preferiblemente el producto alimenticio para animales es un producto a base de grano. Preferiblemente el producto a base de grano comprende cereal(es), por ejemplo, uno o más de maíz, trigo, cebada, centeno, arroz, sorgo y mijo. También preferidos son productos a base de grano comprendiendo material derivado de uno o más de maíz, trigo, cebada, centeno, arroz, sorgo y mijo. En una forma de realización, el producto alimenticio para animales US2003/073239 enseña el uso de secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de zearalenona esterasa,
- 30 aislados del hongo *Gliocladium roseum*, para detoxificación de zearalenona y micotoxinas estructuralmente relacionadas. Puede, por ejemplo, derivar solamente de cereal(es), y en otra forma de realización parcialmente de leguminosas, por ejemplo, de semilla de soja, y parcialmente de cereales. El producto a base de grano puede comprender grano entero o molido, por ejemplo, grano seco o mojado molido, incluyendo producto a base de grano comprendiendo fracciones de grano seco o mojado molido, por ejemplo, gluten, proteína, almidón, y/o fracciones de
- 35 aceite. También preferidos son productos comprendiendo un subproducto de elaboración y/o procesos de fermentación, por ejemplo, grano agotado. Grano agotado es el subproducto de la producción de bebidas alcohólicas y combustibles de etanol. Grano agotado de cerveza (BSG) es el residuo de fabricación de cerveza en cervecerías, que usa cebada malteada como la materia prima más importante. Grano agotado de destilería (DSG) es el producto que queda en destilerías después de que el alcohol se quita por destilación de los granos fermentados tales como maíz, trigo, cebada, arroz y centeno. Grano agotado de destilería es también conocido como grano de los destiladores. Grano mojado de los destiladores (WDG) se seca para producir grano seco de destilería (DDG) que se usa principalmente como alimento para animales.

Cutinasas

- 45 [0019] En el contexto de esta invención el término "cutinasas" incluye enzimas comprendidas por la clasificación enzimática E.C.3.1.1, 4. Preferidas son las enzimas mencionadas debajo, al igual que enzimas con secuencia homóloga, especialmente recombinante y/o enzimas sustancialmente purificadas.
- 50 [0020] La cutinasa puede derivar de un hongo. Particularmente, la cutinasa puede derivar de una cepa de *Humicola*, particularmente *H. insolens*, más particularmente cepa *H. insolens* DSM1800 (US 5,827,719) o de una cepa de *Fusarium*, por ejemplo *F. roseum culmorum*, o particularmente *F. solani pisi* (WO 90/09446, WO 94/14964, WO 94/03578). La cutinasa fúngica puede también ser derivada de una cepa de *Rhizoctonia*, por ejemplo *R. solani*, o una cepa de *Alternaria*, por ejemplo, *A. brassicicola* (WO 94/03578). La cutinasa puede también ser una variante de
- 55 una cutinasa progenitora tales como las descritas en WO 00/34450, o WO 01/92502, todas las que son por la presente incorporadas por referencia. La cutinasa puede ser la variante de la cutinasa de *Humicola insolens* comprendiendo las sustituciones, E6Q, G8D, A14P, N15D, E47K, S48E, R51 P, A88H, A91 H, A130V, E179Q y R189V, que está descrita en la p. 24, línea 11 de 10038.204-WO.
- 60 [0021] La SEC ID nº1 es la secuencia de aminoácidos de la cutinasa de *Humicola insolens* (correspondiente a la parte madura de la SEC ID nº2 de US 5,827,719, y de la SEC ID nº1 de WO 01/92502), y la SEC ID nº2 es la secuencia de aminoácidos del *Fusarium solani pisi* según la Fig. 1D de WO 94/14964.
- 65 [0022] La cutinasa debe estar presente en el medio par ser detoxificado en cantidades eficaces. Preferiblemente la cutinasa está presente en concentraciones de 0,01-100 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca,

preferiblemente 0,1-10 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca, o más preferiblemente 1-5 mg proteína enzimática pr. kg de sustancia seca.

El medio

[0023] En una forma de realización la cutinasa está degradando la zearalenona en un medio comprendiendo el producto alimenticio para animales. El medio es preferiblemente acuoso y puede ser un líquido, una pasta o una suspensión. Para formar un medio adecuado, agua se puede añadir al producto alimenticio para animales. La cutinasa está comprendida en formulaciones sólidas o líquidas adecuadas para aplicación en dicho medio.

[0024] En una forma de realización, la cutinasa está degradando la zearalenona en una extensión por la cual el contenido de zearalenona por kg de producto alimenticio para animales de sustancia seca se reduce a menos de 50%, preferiblemente menos de 60%, más preferiblemente menos de 70%, y de forma más preferida a menos de 80% de la cantidad inicial.

[0025] La eficiencia de detoxifixation de la invención depende de, por ejemplo, disponibilidad de agua, pH, temperatura y tampón del medio. Por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a un valor de pH en el que la actividad relativa de la cutinasa real es al menos 50, o 60, o 70, o 80 o 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede ocurrir a una temperatura en la que la actividad relativa de la cutinasa real es al menos 50, o 60, o 70, o 80 o 90%. La actividad relativa se calcula en relación a la actividad en el valor de pH donde la actividad máxima es observada.

pH en el medio

[0026] Dependiendo, entre otras cosas, de las características de la cutinasa empleada, el pH en el medio empleado debería estar normalmente en el intervalo de 5-11, preferiblemente en el intervalo 6-10, por ejemplo, 6,5-8,5.

Temperatura en el medio

[0027] Preferiblemente una temperatura de reacción se aplica que está cerca de la temperatura óptima para la cutinasa. En numerosas formas de realización de la invención, temperaturas en el intervalo de 10-65°C, más preferiblemente 30-50°C, deberían ser empleadas.

Duración del tratamiento

[0028] La duración del tratamiento depende, entre otras cosas, del tipo de tratamiento, el tipo de artículo que va a ser tratado, las propiedades del medio, por ejemplo, temperatura y pH y el tipo y cantidades de enzima empleados.

[0029] La reacción enzimática continúa hasta que el resultado deseado es conseguido, después de lo cual puede o no puede ser detenida inactivando la enzima, por ejemplo, por un paso de tratamiento térmico.

[0030] Para fines de detoxificación, tiempos de tratamiento se pueden emplear en el intervalo de 1 minuto a 1 semana.

En muchos casos, un tiempo de tratamiento en el intervalo de 6 a 48 horas será adecuado.

Identidad

[0031] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

[0032] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos es determinado usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol.Biol.* 48: 443-453) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: *The European Molecular Biology Open Software Suite*, Rice et al., 2000, *Trends in Genetics* 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización abierta de espacio de 10, penalización de extensión del espacio de 0,5, y LA matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión de BLOSUM62). La salida de Needle marcado como "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/Longitud de alineamiento – Número total de espacios en alineamiento)

[0033] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de desoxirribonucleótido es determinado usando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *supra*) como implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: *The European Molecular Biology Open Software Suite*, Rice et al., 2000, *supra*), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización abierta de espacio de 10, penalización de extensión del espacio de 0,5, y la EDNAFULL matriz de

sustitución (EMBOSS versión de NCBI NUC4.4). La salida de Needle marcada "identidad más larga" (obtenida usando la opción -nobrief) se usa como el identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/Longitud de alineamiento – Número total de espacios en alineamiento)

Secuencia homóloga

[0034] El término "secuencia homóloga" se define como una proteína predicha que da un valor E (o puntuación de expectativa) de menos que 0,001 en una búsqueda tfasti (Pearson, W.R., 1999, in *Bioinformatics Methods and Protocols*, S. Misener and S. A. Krawetz, ed., pp. 185-219) con una secuencia específica.

[0035] El término "secuencia homóloga" puede también definirse como una secuencia que tiene un grado de identidad al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o incluso 100%, a una secuencia específica.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0036]

Enzima: una composición enzimática producida por recombinación que comprende la variante de la cutinasa de *Humicola insolens* descrita en la p. 24, línea 11 de 10038.204-WO.

Ensayo: reacciones fueron realizadas en volúmenes 300 microL en tubos eppendorf que comprenden 30 microM de zearalenona, 100 mM de Trisy 0,1 mg de enzima EP/ml. En las reacciones de control el volumen enzimático fue sustituido una cantidad equivalente de H₂O. Las reacciones fueron incubadas 24 horas a 37°C antes de ser terminadas añadiendo 600 microL de una solución 100 microM de parada de acetonitrilo. Reacciones fueron almacenadas a -20° C hasta análisis cromatográfico.

Análisis cromatográfico: muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante analizado para zearalenone por HPLC-DAD como descrito por Smedsgaard (*J. Chromatogr. A*, 1997, 760, 264-270). El escaneado DAD de 200-600 nm. Separación fue hecha en un Phenomenex (Torrance, CA) Luna C18(2) 10×2 mm ID, 3 micrómetro, columna 2, usando una forma de movimiento de gradiente lineal de 5% a 100% de acetonitrilo en 20 min. Zearalenona residual fue calculada relativamente en el control. Los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Zearalenona residual después de 24 horas de incubación con o sin una cutinasa a pH 7

Enzima	Zearalenona residual (%)
Control	100
Cutinasa	19

Listado de secuencias

[0037]

<110> Novozymes A/S

<120> CUTINASA PARA DETOXIFICACIÓN DE PRODUCTOS ALIMENTICIOS PARA ANIMALES

<130> 11339.204-WO

<160> 2

<170> Versión de patentIn 3.5

<210> 1

<211> 194

<212> PRT

<213> *Humicola insolens*

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(194)

<400> 1

ES 2 386 326 T3

Gln Leu Gly Ala Ile Glu Asn Gly Leu Glu Ser Gly Ser Ala Asn Ala
1 5 10 15

Cys Pro Asp Ala Ile Leu Ile Phe Ala Arg Gly Ser Thr Glu Pro Gly
20 25 30

Asn Met Gly Ile Thr Val Gly Pro Ala Leu Ala Asn Gly Leu Glu Ser
35 40 45

His Ile Arg Asn Ile Trp Ile Gln Gly Val Gly Gly Pro Tyr Asp Ala
50 55 60

Ala Leu Ala Thr Asn Phe Leu Pro Arg Gly Thr Ser Gln Ala Asn Ile
65 70 75 80

Asp Glu Gly Lys Arg Leu Phe Ala Leu Ala Asn Gln Lys Cys Pro Asn
85 90 95

Thr Pro Val Val Ala Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Ala Leu Ile Ala
100 105 110

Ala Ala Val Ser Glu Leu Ser Gly Ala Val Lys Glu Gln Val Lys Gly
115 120 125

Val Ala Leu Phe Gly Tyr Thr Gln Asn Leu Gln Asn Arg Gly Gly Ile
130 135 140

Pro Asn Tyr Pro Arg Glu Arg Thr Lys Val Phe Cys Asn Val Gly Asp

<210> 2

<211> 199

5 <212> PRT

<213> Fusarium solani pisi

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1)..(199)

<400> 2

ES 2 386 326 T3

Gly Arg Thr Thr Arg Asp Asp Leu Ile Asn Gly Asn Ser Ala Ser Cys
1 5 10 15

Ala Asp Val Ile Phe Ile Tyr Ala Arg Gly Ser Thr Glu Thr Gly Asn
20 25 30

Leu Gly Thr Leu Gly Pro Ser Ile Ala Ser Asn Leu Glu Ser Ala Phe
35 40 45

Gly Lys Asp Gly Val Trp Ile Gln Gly Val Gly Gly Ala Tyr Arg Ala
50 55 60

Thr Leu Gly Asp Asn Ala Leu Pro Arg Gly Thr Ser Ser Ala Ala Ile
65 70 75 80

Arg Glu Met Leu Gly Leu Phe Gln Gln Ala Asn Thr Lys Cys Pro Asp
85 90 95

Ala Thr Leu Ile Ala Gly Gly Tyr Ser Gln Gly Ala Ala Leu Ala Ala
100 105 110

Ala Ser Ile Glu Asp Leu Asp Ser Ala Ile Arg Asp Lys Ile Ala Gly
115 120 125

Thr Val Leu Phe Gly Tyr Thr Lys Asn Leu Gln Asn Arg Gly Arg Ile
130 135 140

REIVINDICACIONES

1. Proceso para degradación de zearalenona en un producto alimenticio para animales, este proceso comprende tratamiento de dicho producto alimenticio para animales con una cutinasa.
- 5 2. Proceso según la reivindicación 1, donde la dosificación de la cutinasa es 0,01-100 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca, preferiblemente 0,1-10 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca, o más preferiblemente 1-5 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca.
- 10 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el producto alimenticio para animales es un producto alimenticio para animales a base de grano.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el producto alimenticio para animales comprende uno o más seleccionado de maíz, trigo, cebada, centeno, arroz, sorgo y mijo.
- 15 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el producto alimenticio para animales es una composición de alimento para animales.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el producto alimenticio para animales es un subproducto de un proceso de fermentación.
- 20 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el producto alimenticio para animales comprende grano gastado de cerveza, grano consumido de destilería, grano mojado de destilería y/o grano seco de destilería.
- 25 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el producto alimenticio para animales es un producto alimenticio para cerdos.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la cutinasa es una cutinasa con la secuencia mostrada en la SEC ID nº1 o una secuencia homóloga.
- 30 10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la cutinasa es una variante de la cutinasa mostrada en la SEC ID nº1 comprendiendo uno o más, incluyendo todas las sustituciones G8D, N15D, S48E, A88H, N91H, A130V y R189V.
- 35 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la cutinasa es una cutinasa con la secuencia mostrada en la SEC ID nº2 o una secuencia homóloga.
12. Uso de una cutinasa para la degradación de la micotoxina zearalenona.
- 40 13. Uso según la reivindicación 12 en un producto alimenticio para animales a base de grano.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, donde la dosificación de la cutinasa es 0,01-100 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca, preferiblemente 0,1-10 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca, o más preferiblemente 1-5 mg de proteína enzimática pr. kg de sustancia seca.