

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 415**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/56** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

**A23K 1/165** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2006 E 06764594 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1877561**

54 Título: **Gen abfB-1 de Penicillium funiculosum**

30 Prioridad:

**04.05.2005 FR 0504562**

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

**06.06.2013**

73 Titular/es:

**ADISSEO FRANCE S.A.S. (100.0%)  
IMMEUBLE ANTONY PARC II 10, PLACE DU  
GÉNÉRAL DE GAULLE  
92160 ANTONY, FR**

72 Inventor/es:

**FRANCOIS, JEAN MARIE;  
PARROU, JEAN-LUC;  
TOURRASSE, OLIVIER y  
NORE, OLIVIER**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 406 415 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

Gen *abfB*-1 de *Penicillium funiculosum*.

- 5 La invención se refiere al gen *abfB*-1 aislado de *Penicillium funiculosum* y al polipéptido ABFB-1 codificado por este gen que tiene una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B.

10 *Penicillium funiculosum* es un *Talaromyces* que pertenece a la familia de las *Aspergilleae*. El aislamiento de este microorganismo a partir de numerosos sustratos orgánicos sujetos a una contaminación aérea o acuosa, indica que este hongo posee una panoplia de enzimas hidrolíticas de una riqueza sorprendente. La utilización de este cóctel enzimático en la alimentación animal contribuye a la despolimerización de las sustancias orgánicas naturales y permite mejorar su digestibilidad. El documento WO 99/57325 describe así una cepa de *Penicillium funiculosum* denominada IMI378536 que produce una mezcla de enzimas particularmente adaptada a la alimentación animal. Sin embargo, los cócteles enzimáticos producidos por *Penicillium funiculosum* están poco caracterizados bioquímicamente. En efecto, sólo un número restringido de actividades enzimáticas como las xilanasas, las  $\beta$ -glucanasas se miden generalmente sobre los mostos de fermentación obtenidos. Estas actividades reflejan sólo una fracción de la población enzimática presente en el cóctel.

20 Los compuestos hemi-celulolíticos procedentes de la agricultura constituyen la segunda reserva de polisacáridos después de la celulosa en el seno de los tejidos vegetales. Este grupo se caracteriza por una amplia variedad de heteropolisacáridos, de los cuales los principales representantes son los xilanos, los arabinanos, los galactanos, los glucanos, y los mananos. La arabinosa en su forma furfural está ampliamente representada en el seno de los heteropolisacáridos tales como los arabinanos y los arabinoxilados. El arabinano es un polímero de residuos arabinofuranosa unido por unos enlaces  $\alpha$ -1-5, y puede estar sustituido con 1 o 2 residuos de arabinosa en posición O-2 u O-3. En lo que se refiere a los arabinoxilanos, los residuos  $\alpha$ -L-arabinofuranosilo están unidos sobre la cadena principal  $\beta$ -1-4-xilopiranosilo por unos enlaces  $\alpha$ -1-3 y  $\alpha$ -1-2. La presencia de residuos arabinosa sobre estas cadenas laterales puede restringir la hidrólisis enzimática de los compuestos hemi-celulolíticos en numerosas aplicaciones industriales tales como la mejora de la digestibilidad de la alimentación animal. Las enzimas que escinden los enlaces  $\alpha$ -L-arabinofuranosídicos pueden actuar sinérgicamente con las xilanasas para permitir la hidrólisis de los arabinoxilanos y arabinanos.

30 Las actividades arabinasas (endo-, exo-arabinasas y mayoritariamente las actividades  $\infty$ -L-arabinofuranosidasas) pueden contribuir por lo tanto activamente y de manera sinérgica con las xilanasas a la despolimerización de los compuestos hemi-celulolíticos. Los compuestos hemi-celulolíticos y pécticos pueden representar hasta el 50% de los carbohidratos totales presentes en las plantas, y constituyen una importante fuente de energía para los animales. La mejora de la digestibilidad de estos compuestos está correlacionada con la disminución del grado de sustitución de los residuos arabinosilos en el seno de unos compuestos hemi-celulolíticos (Brice, R.E., Morrison, I.M. 1982, Carbohydr. Res. 101: 93-100).

40 Se han aislado las enzimas que hidrolizan los enlaces entre unos residuos L-arabinosa a partir de microorganismos tales como las bacterias o los hongos filamentosos. Las arabinosidasas están constituidas principalmente por  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) que son capaces de hidrolizar los residuos  $\alpha$ -L-arabinofuranosilo no reductores procedentes del L-arabinoxilano o por compuestos tales como los arabinanos, y los arabinogalactanos.

45 Se han clasificado las  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) en dos familias de glicósidos hidrolasas (GH 51 y GH 54) según su similitud de secuencia proteica. Estas dos familias difieren debido a su especificidad de sustrato contenido en los polisacáridos. El primer grupo (GH 51) contiene las arabinofuranosidasas de tipo A que actúan sólo sobre pequeñas estructuras lineales de arabinofuranosil-oligosacáridos unidos en  $\alpha$ -1-5. El segundo grupo está constituido por arabinofuranosidasas de tipo B (GH 54) que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,5;  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ 1,2 de las cadenas laterales contenidas en los compuestos arabinofuranosil-oligosacáridos.

50 Se han aislado las arabinofuranosidasas B (ABFB) a partir de numerosas bacterias, pero también a partir de hongos filamentosos. El género *Aspergillus* es el más representado, pero se han aislado también a partir de los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, y *Fusarium*.

55 Los documentos WO96/29416, WO96/06935, WO 2004/018662 y US nº 5.989.887 describen unos genes de arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger*. La alineación de secuencias proteicas indica que la proteína *abfB* de *A. niger* es 72,4% idéntica a la proteína ABFB-1 de *P. funiculosum*. En estas solicitudes no se describe ninguna de las características esenciales de la utilización del polipéptido en nutrición animal.

60 Clinche *et al.* (J. Agric. Food Chem., 45, 2379-2383, 1997) han descrito tres -L-arabinofuranosidasas procedentes de *Aspergillus terreus* que tienen una aplicación potencial en enología.

65 Gielkens *et al.* (Microbiology, 145, 735-741, 1999) han descrito el gen *abfB* de *Aspergillus nidulans*.

Los genes *abfB* de *Aspergillus kawachii* y de *Aspergillus awamori* han sido descritos por Koseki *et al.* (J. of Bioscience and Bioengineering, vol. 96, nº 3, 232-241, 2003). Estas enzimas tienen unas aplicaciones en la fermentación del licor japonés *shochu*.

5 El gen *abfB* del hongo filamentoso *Trichoderma reesei* ha sido descrito por Margolles-Clark *et al.* (Applied and Environmental Microbiology, 3840-3846, 1996).

Panagiotou *et al.* han descrito asimismo dos alpha-L-arabinofuranosidasas extracelulares procedentes de *Fusarium oxysporum*. (Can J Microbiol. 2003: 49(10):639-4).

10 Carvalho *et al.* (Mycol. Res., 107 (4), 388-394, 2003) han descrito la  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium purpurogenum*. La alineación de secuencias proteicas indica que la proteína *abf-1* de *P. purpurogenum* es 85,6% idéntica a la proteína ABFB-1 de *P. funiculosum*. En este artículo no se describe ninguna de las características esenciales de la utilización del polipéptido en nutrición animal.

15 Sakamoto *et al.* (FEBS Letters 560, 199-204, 2004) han descrito el gen *abnx* de *Penicillium chrysogenum* que codifica sin embargo para una actividad arabinanasa distinta de la actividad de las ABFB.

20 Sin embargo estas enzimas ABFB no tienen las cualidades óptimas requeridas para una aplicación en la alimentación animal. En efecto, para ser utilizables en alimentación animal, las ABFB deben poseer unas propiedades compatibles con los tratamientos que sufren los alimentos destinados a esta alimentación. En particular, la actividad de las enzimas utilizadas debe ser estable en las condiciones de temperatura y de pH de los procedimientos, y si es posible ser óptima en la preparación de estos alimentos así como en las condiciones presentes en el sistema digestivo de los animales que ingieren estos alimentos.

25 Además, estas enzimas deben tener un amplio espectro de acción (desenganche) sobre los heteropolisacáridos (arabinasas, arabinoxilanos y arabinogalactanos) para permitir una mejora eficaz de la digestibilidad de los alimentos por los animales. Esta mejora de la digestibilidad de los alimentos para animales permite aumentar su valor nutricional. Así, las enzimas que tienen una especificidad (estereo-especificidad, enantioselectividad), una actividad o una afinidad mejorada frente a los sustratos naturales arabinoxilanos y arabinanos presentan un gran interés para la alimentación animal.

30 La presente invención describe una L-arabinofuranosidasa B (ABFB-1) de *Penicillium funiculosum*, adaptada para una aplicación en la nutrición animal así como el gen que codifica para esta enzima. La invención se refiere asimismo a los homólogos, a las variantes y a los fragmentos de la ABFB-1 que conservan las mismas propiedades catalíticas.

Ventajosamente, las enzimas ABFB según la invención presentan una temperatura óptima elevada.

40 Otra ventaja de la presente invención es que la expresión de la ABFB-1 de *Penicillium funiculosum* está naturalmente fuertemente inducida en este hongo en unas condiciones de inducción de enzimas celulolíticas y hemi-celulolíticas (medio de cultivo de tipo industrial para la producción de enzimas celulolíticas y hemi-celulolíticas).

45 Las enzimas según la invención tienen asimismo otras aplicaciones industriales o agro-industriales. Se citará en particular el tratamiento de los zumos de frutas, la fabricación de papel, la conversión de biomasas hemi-celulolíticas en carburantes o productos químicos, la preparación de bebidas alcoholizadas por fermentación.

### Descripción de las secuencias

50 SEC ID nº 1: Secuencia genómica el gen *abfB-1* de *Penicillium funiculosum*.

SEC ID nº 2: Secuencia del polipéptido ABFB-1 de *Penicillium funiculosum* que tiene una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa de tipo B.

55 SEC ID nº 3: Cebador XbaI-*abfB*.

SEC ID nº 4: Cebador HindIII-*abfB*.

### Descripción de la invención

60 La presente invención se refiere a un polipéptido adaptado a la utilización en nutrición animal que comprende un polipéptido seleccionado DE entre los polipéptidos siguientes:

- el polipéptido de la SEC ID nº 2,
- 65 - el polipéptido cuya secuencia está comprendida entre la posición 28 y la posición 507 de la SEC ID nº 2.

La invención se refiere asimismo a un polinucleótido que codifica para una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B, seleccionado de entre los polinucleótidos siguientes:

- 5
- el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 845 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1,
  - el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 826 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1.

Otro objeto de la presente invención es un polinucleótido que tiene la secuencia representada en la SEC ID nº 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID nº 1.

10 La invención se refiere asimismo a unos casetes de expresión que comprenden en el sentido de la transcripción:

- un promotor funcional en un organismo hospedante;
- un polinucleótido según la invención; y
- una secuencia terminadora funcional en el mismo organismo hospedante.

15 Otro objeto de la invención es un vector que comprende un polinucleótido según la invención y/o un casete de expresión según la invención.

20 La invención se refiere asimismo a un organismo hospedante transformado con un polinucleótido según la invención, un casete de expresión según la invención y/o un vector según la invención.

En un modo de realización de la invención, el organismo hospedante se selecciona de entre las levaduras y los hongos filamentosos.

25 Preferentemente, el organismo hospedante es una cepa de *Penicillium funiculosum*.

La invención se refiere asimismo a un aditivo nutricional para animales que comprende un polipéptido según la invención, un organismo hospedante según la invención y un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención.

30 Preferentemente, este aditivo nutricional se presenta en forma líquida o en forma de polvo.

Otro aspecto de la invención es un alimento para animales que comprende una base nutricional para animales y un aditivo nutricional para animales según la invención.

35 La invención se refiere asimismo a la utilización de un polipéptido ABFB según la invención o de un organismo hospedante según la invención para la fabricación de un aditivo nutricional para animales o de un alimento para animales.

40 Otro objeto de la invención es la utilización de un polipéptido ABFB según la invención o de un organismo hospedante según la invención para la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -L-arabinofuranosilo de los compuestos arabinofuranosil-oligosacáridos.

#### Polipéptidos

45 La presente invención se refiere por lo tanto a unos polipéptidos ABFB que tienen una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, estos polipéptidos están aislados de *Penicillium funiculosum*.

50 Se entiende por " $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B", unas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) de tipo B (GH 54) que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -1,5;  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,2 de las cadenas laterales contenidas en los compuestos arabinofuranosil-oligosacáridos.

La  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B de la cepa IMI378536 de *Penicillium funiculosum* está representada en la SEC ID nº 2.

55 Se entiende por "polipéptido adaptado a la utilización en nutrición animal" un polipéptido cuyas características son tales que conviene para la nutrición animal. Las características esenciales para una utilización en nutrición animal son en particular el pH y la temperatura a los que se activa la enzima. En efecto, el pH del sistema digestivo de los animales es ácido y es por lo tanto esencial que la enzima permanezca activa a este pH, con el fin de conservar su actividad en la hidrólisis de los residuos L-arabinosa. Además, la puesta en forma de la enzima en un aditivo nutricional o en el alimento del animal implica unos tratamientos y una temperatura superior a la temperatura ambiente. La actividad de las enzimas utilizadas debe por lo tanto ser estable en las condiciones de los procedimientos, en particular las condiciones de temperaturas.

65 Según un modo de realización de la presente invención, el polipéptido presenta una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B a un pH ácido, por ejemplo inferior a 5, preferentemente inferior a 4. Asimismo, según un

modo de realización de la presente invención, el polipéptido presenta una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B óptima entre pH 2 y pH 3,5.

5 Según un modo de realización preferido de la presente invención, el polipéptido presenta una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B a unas temperaturas superiores a la temperatura ambiente. Preferentemente, el polipéptido de la presente invención posee una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B óptima a una temperatura comprendida entre 40°C y 70°C, más preferentemente entre 50°C y 65°C.

10 En un modo de realización preferido, los polipéptidos según la invención están glicosilados. El polipéptido de la SEC ID nº 2 posee en particular unos sitios de N-glicosilación en el aminoácido 92 y en el aminoácido 376. En un modo de realización preferido, los residuos asparagina en posición 92 y 376 del polipéptido de la SEC ID nº 2 están glicosilados.

15 La  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum* es una enzima segregada por el hongo en su entorno extracelular. El polipéptido de la SEC ID nº 2 comprende así un péptido señal de 27 aminoácidos. La invención tiene asimismo por objeto el polipéptido maduro obtenido después de la escisión del péptido señal. En particular, la invención se refiere al polipéptido cuya secuencia está comprendida entre la posición 28 y la posición 507 de la SEC ID nº 2.

20 En otro modo de realización, el péptido señal del polipéptido de la SEC ID nº 2 puede ser sustituido por un péptido señal heterólogo para la expresión y la secreción del polipéptido de la SEC ID nº 2 por un organismo hospedante heterólogo.

25 La invención se refiere asimismo a unos fragmentos del polipéptido de la SEC ID nº 2 que tiene una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B.

El término "fragmento" de un polipéptido designa un polipéptido que comprende una parte pero no la totalidad del polipéptido del cual se deriva.

30 Este fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 conserva su actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B. La invención se refiere por lo tanto a los fragmentos biológicamente activos del polipéptido de la SEC ID nº 2. El término "fragmento biológicamente activo" designa un fragmento de un polipéptido que conserva la función del polipéptido del cual se deriva. Los fragmentos biológicamente activos del polipéptido de la SEC ID nº 2 conservan así la función del polipéptido ABFB-1 de *Penicillium funiculosum*. Estos fragmentos biológicamente activos tienen una actividad de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B.

Los métodos de preparación de fragmentos de un polipéptido así como las técnicas de medición de la actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B son bien conocidos por el experto en la materia.

40 Los polipéptidos según la invención están aislados o purificados de su entorno natural. Los polipéptidos pueden ser preparados por medio de diferentes procedimientos. Estos procedimientos son en particular la purificación a partir de fuentes naturales tales como unas células que expresan naturalmente estos polipéptidos, la producción de polipéptidos recombinantes por unas células hospedantes apropiadas y su purificación ulterior, la producción por síntesis química o, por último, una combinación de estos diferentes enfoques. Estos diferentes procedimientos de producción son bien conocidos por el experto en la materia. Así, los polipéptidos ABFB de la presente invención pueden ser aislados a partir de *Penicillium funiculosum*. En otro modo de realización, los polipéptidos ABFB de la presente invención son aislados a partir de organismos hospedantes recombinantes que expresan un polipéptido ABFB según la invención.

50 La invención tiene asimismo por objeto unas proteínas de fusión, unas proteínas recombinantes o unas proteínas quimeras que comprenden los polipéptidos según la invención. El término "polipéptido" designa asimismo unas proteínas así como unos polipéptidos modificados.

55 Los polipéptidos según la invención tienen una actividad ABFB y conservan preferentemente las propiedades catalíticas de la enzima ABFB-1 de *Penicillium funiculosum*. En particular, estos polipéptidos presentan una actividad óptima a 60°C y a pH 3,4.

#### Polinucleótidos

60 La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos que codifican para una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, estos polinucleótidos codifican una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum*.

65 Según la presente invención, se entiende por "polinucleótido" una cadena nucleotídica monocatenaria o su complementario que puede ser de tipo ADN o ARN, o una cadena nucleotídica bicatenaria que puede ser de tipo ADN complementario o genómico. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en

particular de ADN bicatenario. El término "polinucleótido" designa también los polinucleótidos modificados.

Los polinucleótidos de la presente invención están aislados o purificados de su entorno natural. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención pueden ser preparados mediante las técnicas clásicas de biología molecular tales como las descritas por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) o mediante síntesis química.

En un primer modo de realización, la invención se refiere al polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 845 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1. Este polinucleótido codifica para la enzima ABFB-1 de *Penicillium funiculosum* de la SEC ID nº 2.

En un segundo modo de realización, la invención se refiere al polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 926 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1. Este polinucleótido codifica para el polipéptido maduro ABFB de *Penicillium funiculosum* después de la escisión del péptido señal.

La invención se refiere asimismo a unos polinucleótidos capaces de hibridarse de manera selectiva con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 845 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1 y/o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 926 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1. Preferentemente, la hibridación selectiva se efectúa en unas condiciones de media astringencia y preferentemente en unas condiciones de fuerte astringencia. Estos polinucleótidos codifican para una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, estos polinucleótidos codifican para una  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum*.

Por "secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva", se entiende según la invención las secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de manera significativa. El nivel de la señal generada por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de manera selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces, más intensa que la de la interacción de las demás secuencias de ADN que generan el ruido de fondo. Las condiciones de hibridación astringentes que permiten una hibridación selectiva son bien conocidas por el experto en la materia. En general, la temperatura de hibridación y de lavado es inferior en por lo menos 5°C a la Tm de la secuencia de referencia a un pH dado y para una fuerza iónica dada. Típicamente, la temperatura de hibridación es de por lo menos 30°C para un polinucleótido de 15 a 50 nucleótidos y de por lo menos 60°C para un polinucleótido de más de 50 nucleótidos. A título de ejemplo, la hibridación se realiza en el tampón siguiente: 6X SSC, 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM de EDTA, 0,02% de PVP, 0,02% de Ficoll, 0,02% de BSA, 500  $\mu$ g/ml de esperma de salmón desnaturalizado DNA. Los lavados se realizan por ejemplo sucesivamente a baja astringencia en un tampón 2X SSC, 0,1% de SDS a media astringencia en un tampón 0,5X SSC, 0,1% de SDS y a fuerte astringencia en un tampón 0,1X SSC, 0,1% de SDS. La hibridación se puede efectuar evidentemente según otros métodos habituales bien conocidos por el experto en la materia (véase en particular Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989). Preferentemente, los polinucleótidos que se hibridan de manera selectiva a un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia. En el presente caso, los polinucleótidos, que se hibridan de manera selectiva con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 845 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1 y/o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 926 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1, codifican para una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B.

La invención se refiere de manera general a los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos según la invención. Debido a la degenerescencia del código genético, diferentes polinucleótidos pueden codificar para un mismo polipéptido.

Otro objeto de la presente invención es un polinucleótido cuya secuencia está representada en la SEC ID nº 1. El polinucleótido de la SEC ID nº 1 comprende unas secuencias que flanquean el marco abierto de lectura (ORF) del gen *abfB-1* de *Penicillium funiculosum*. Se trata en particular de las secuencias promotoras y terminadoras del gen *abfB-1*. El gen *abfB* se puede expresar a partir de sus secuencias reguladoras homólogas en particular para una sobreexpresión en *Penicillium funiculosum* o en otros hongos filamentosos.

En otro modo de realización, el gen *abfB* se puede expresar en diferentes organismos hospedantes tales como las bacterias, las levaduras y los hongos por ejemplo. El gen *abfB* se puede expresar en un organismo hospedante bajo el control del promotor de la SEC ID nº 1 de la presente invención o bajo el control de un promotor heterólogo.

#### Casetes de expresión

Según un modo de realización de la invención, un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la invención se inserta en un casete de expresión utilizando unas técnicas de clonación bien conocidas por el experto en la materia. Este casete de expresión comprende los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de las secuencias que codifican para los polipéptidos según la invención.

Ventajosamente, este casete de expresión comprende al mismo tiempo unos elementos que permiten hacer producir un polipéptido por una célula hospedante y unos elementos necesarios para la regulación de esta expresión.

Estos casetes de expresión comprenden, en el sentido de la transcripción:

- 5
- un promotor funcional en un organismo hospedante;
  - un polinucleótido según la invención;
  - una secuencia terminadora funcional en el mismo organismo hospedante.

10 Se puede utilizar cualquier tipo de secuencia promotora en los casetes de expresión según la invención. La elección del promotor dependerá en particular del organismo hospedante seleccionado para la expresión del gen de interés. Algunos promotores permiten una expresión constitutiva mientras que otros promotores son por el contrario inducibles. Entre los promotores funcionales en los hongos, se citará en particular el de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* (Roberts *et al.*, Current Genet. 15:177-180, 1989). Entre los promotores funcionales en las bacterias, se citará en particular el de la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (Studier *et al.*, Methods in enzymology 185:60-89, 1990). Entre los promotores funcionales en las levaduras, se citará el promotor del gen *GAL1* (Elledge *et al.*, Proc Natl Acad Sciences, USA. 88:1731-1735, 1991) o los promotores *GAL4* y *ADH* de *S. cerevisiae*. Todos estos promotores están descritos en la bibliografía y son bien conocidos por el experto en la materia.

20 Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden un promotor histona H4.B, un promotor ácido aspártico proteasa o un promotor csl13 (WO 00/68401).

25 Los casetes de expresión según la presente invención pueden incluir además cualquier otra secuencia necesaria para la expresión de los polipéptidos o de los polinucleótidos como, por ejemplo, unos elementos de regulación o unas secuencias señal que permiten la secreción de los polipéptidos producidos por el organismo hospedante. Se puede utilizar en particular cualquier secuencia de regulación que permita aumentar el nivel de expresión de la secuencia codificante insertada en el casete de expresión. Según la invención, se pueden utilizar en particular, en asociación con la secuencia de regulación promotora, otras secuencias de regulación, que están situadas entre el promotor y la secuencia codificante, tales como unos activadores de transcripción ("enhancer").

30 Se puede utilizar una gran variedad de secuencias terminadoras en los casetes de expresión según la invención, estas secuencias permiten la terminación de la transcripción y la poliadenilación del ARNm. Se puede utilizar cualquier secuencia terminadora funcional en el organismo hospedante seleccionado.

35 Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se seleccionarán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden un terminador histona H4.B, un terminador ácido aspártico proteasa o un terminador csl13 (WO 00/68401).

40 La presente invención tiene asimismo por objeto un polinucleótido que comprende un casete de expresión según la invención, ventajosamente los casetes de expresión según la presente invención están insertados en un vector.

#### Vectores

45 La presente invención se refiere por lo tanto también a unos vectores de replicación o de expresión para la transformación de un organismo hospedante que comprende por lo menos un polinucleótido o un casete de expresión según la presente invención. Este vector puede corresponder en particular a un plásmido, a un cósmido, a un bacteriófago o a un virus en el que está insertado un polinucleótido o un casete de expresión según la invención. Las técnicas de construcción de estos vectores y de inserción de un polinucleótido de la invención en estos vectores son bien conocidas por el experto en la materia. De manera general, se puede utilizar cualquier vector capaz de mantenerse, de autoreplicarse o de propagarse en una célula hospedante con el fin de inducir en particular la expresión de un polinucleótido o de un polipéptido. El experto en la materia seleccionará los vectores apropiados en función del organismo hospedante a transformar, y en función de la técnica de transformación utilizada.

50 Los vectores de la presente invención se utilizan en particular para transformar un organismo hospedante con vistas a la replicación del vector y/o a la expresión de un polipéptido según la invención en el organismo hospedante.

55 La invención se refiere asimismo a un método para preparar un polipéptido según la invención que comprende las etapas siguientes:

- 60
- se transforma un organismo hospedante con un vector de expresión que comprende un casete de expresión según la invención y/o con un polinucleótido según la invención,
  - se aíslan los polipéptidos producidos por el organismo hospedante.

#### Organismos hospedantes

65 La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de transformación de un organismo hospedante

mediante integración en dicho organismo hospedante de por lo menos un polinucleótido o de un casete de expresión o de un vector según la invención. El polinucleótido puede estar integrado en el genoma del organismo hospedante o replicarse de manera estable en el organismo hospedante. Los métodos de transformación de los organismos hospedantes son bien conocidos por el experto en la materia y están ampliamente descritos en la bibliografía.

La presente invención se refiere asimismo a un organismo hospedante transformado con un polinucleótido, un casete de expresión o un vector según la invención. Por organismo hospedante, se entiende en particular según la invención cualquier organismo mono o pluricelular, inferior o superior, seleccionado en particular de entre las bacterias, las levaduras y los hongos. Por organismo hospedante se entiende un organismo no humano. De manera ventajosa, las levaduras se seleccionan de entre *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* y *Schwanniomyces occidentalis*. Los hongos se seleccionan de entre los *Aspergillus* y los *Penicilliums*, preferentemente de entre *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii* y *Trichoderma koningii*. En un modo de realización preferido, el organismo hospedante es una cepa de *Penicillium funiculosum* en la que se expresa o se sobreexpresa un polipéptido ABFB según la invención.

Las técnicas de construcción de vectores, de transformación de organismos hospedantes y de expresión de proteínas heterólogas en estos organismos están ampliamente descritas en la bibliografía (Ausubel F.M. *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes 1 y 2, Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience, 1989; T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning A laboratory Handbook, 1982).

#### Aditivos alimenticios y alimentos para animales

La presente invención se refiere por lo tanto a unos aditivos alimenticios que aportan una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B. La aportación de este tipo de actividad enzimática permite mejorar la digestibilidad del alimento y aumentar su valor nutricional.

Se entiende por aditivo nutricional una sustancia añadida intencionadamente a un alimento, generalmente en pequeñas cantidades, para mejorar sus características nutricionales o su digestibilidad. Los aditivos nutricionales para animales pueden, por ejemplo, contener unas vitaminas, unas sales minerales, unos aminoácidos y unas enzimas.

Típicamente, los aditivos nutricionales para animales comprenden un polipéptido según la invención, un organismo hospedante según la invención o un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención. Así, los polipéptidos que tienen una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B según la invención pueden ser purificados o aislados de una cepa de *Penicillium funiculosum* o de un organismo hospedante recombinante para la fabricación de un aditivo nutricional para animales. Alternativamente, una cepa de *Penicillium funiculosum* o un organismo hospedante que producen unos polipéptidos AbfB se pueden utilizar directamente para la fabricación de un aditivo nutricional para animales. En un modo de realización preferido de la invención, se utiliza el sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación de una cepa de *Penicillium funiculosum* o de un organismo hospedante según la invención para la fabricación de aditivos nutricionales para animales. Este modo de realización es particularmente ventajoso cuando los polipéptidos ABFB son segregados por la cepa de *Penicillium funiculosum* o el organismo hospedante. Habitualmente, este sobrenadante de cultivo está concentrado o liofilizado para la fabricación del aditivo nutricional.

Así, la invención se refiere asimismo a un procedimiento de preparación de enzima ABFB que comprende las etapas siguientes:

- a) puesta en cultivo de una cepa de *Penicillium funiculosum* o de un organismo hospedante transformado según la invención, en unas condiciones de inducción de la expresión de ABFB,
- b) separar el sobrenadante de cultivo que comprende la enzima ABFB.

Este sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación puede ser concentrado o liofilizado a continuación para la formulación de un aditivo alimenticio o de un alimento para animales.

Si el organismo hospedante no segrega la enzima ABFB en el medio de cultivo, puede ser necesaria una etapa suplementaria de escisión de las células y de purificación del extracto celular.

Los aditivos nutricionales de la presente invención comprenden una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B, pero pueden también comprender otras sustancias nutricionales como unas vitaminas, unos aminoácidos o unas sales minerales.

Los aditivos según la invención aumentan la digestibilidad de los alimentos, contribuyendo así a una mejor valorización nutricional de los regímenes a base de cereales (trigo, cebada, maíz, avena, centeno, etc.) y de tortas oleaginosas (soja, girasol, colza, etc.) en particular.

La presente invención se refiere asimismo a los alimentos para animales que comprenden una base nutricional y un

aditivo nutricional según la invención. Estos alimentos se presentan habitualmente en forma de harinas o de gránulos en los que están incorporados los aditivos según la invención.

Se entiende por alimento todo lo que puede servir para la nutrición de los animales.

Los alimentos para animales comprenden un polipéptido según la invención, un organismo hospedante según la invención o un mosto de fermentación de un organismo hospedante según la invención.

Para la cría intensiva de los animales, estos alimentos comprenden habitualmente una base nutricional y unos aditivos nutricionales.

Se entiende por base nutricional, lo que constituye lo esencial de la ración alimenticia del animal, constituido a título de ejemplo por una mezcla de cereales, de proteínas y de materias grasas de origen animal y/o vegetal.

Las bases nutricionales para animales están adaptadas a la alimentación de estos animales y son bien conocidas por el experto en la materia. Habitualmente, estas bases nutricionales comprenden por ejemplo maíz, trigo, guisante y soja. Estas bases nutricionales están adaptadas a las necesidades de las diferentes especies animales a la que están destinadas. Estas bases nutricionales pueden ya contener unos aditivos nutricionales como unas vitaminas, unas sales minerales y unos aminoácidos.

En un modo de realización preferido, la invención se refiere a unos alimentos para animales monogástricos y en particular para las aves de corral y los cerdos. Las aves de corral comprenden en particular las gallinas ponedoras, los pollos para carne, los pavos y los patos. Los cerdos comprenden en particular los cerdos de crecimiento y de cebado así como los lechones.

#### Descripción de las figuras

Figura 1: Determinación del pH óptimo de la enzima ABFB-1 en una serie de tampón Mc Ilvaine (pH 2,2 a 8) a 40°C en presencia de 5 mM de PNPAF.

Figura 2: Determinación de la temperatura óptima de la enzima ABFB-1 a su pH óptimo en presencia de 5 mM de PNPAF. PNPAF.

Figura 3: Determinación de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_m$  ( $1/V_i = f(1/S)$ ) para ABFB-1 para una gama de PNPAF que va de 0,5 mM a 5 mM a pH 3,4 y 60°C.

Figura 4: Valores de expresión diferencial cuantitativas relativas de los genes *abfB-1* y *abfB-2* en función de las condiciones de crecimiento de *P. funiculosus*.

#### Ejemplos

##### Puesta a punto de la dosificación de la actividad L-arabinofuranosidasa B

La actividad L-arabinofuranosidasa se midió a partir de un cultivo de *P. funiculosus* sobre el medio M2 con una adición mixta compuesta por 0,15% de Provasoy y 0,3% de celulosa al cabo de 40 h. Se realizaron unas extracciones a las 48 h y 72 h de cultivo. El cultivo se realizó en erlen de 200 ml con un volumen útil de 50 ml. La actividad se determinó mediante hidrólisis de 5 mM de para-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa (PNPAF) en un tampón de 50 mM de acetato sódico, pH 5. Se incubaron 50  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo con 250  $\mu$ l de sustrato precalentado a 50°C durante 15 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 500  $\mu$ l de 0,5 M de NaOH. La liberación del p-nitrofenilo (PNP) se midió a 405 nm con un coeficiente de extinción molar de 17000 M<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de PNPAF por minuto en las condiciones descritas anteriormente. Para el cultivo de *P. funiculosus* se obtuvieron 20 mU·ml<sup>-1</sup> al cabo de 48 h y 112 mU·ml<sup>-1</sup> al cabo de 72 h de cultivo. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía, en efecto para *Aspergillus niger* se encontraron unas actividades del orden de 100 a 600 mU·ml<sup>-1</sup> según el inductor utilizado en el cultivo.

##### Clonación del ORF *abfB* de *P. funiculosus* en *Saccharomyces cerevisiae*

A partir del ADN genómico de *P. funiculosus*, se amplificó el gen *abfB* mediante PCR con la ayuda del par de cebadores (Hind III-*abfB*/Xba I-*abfB*) en las condiciones siguientes (94°C 30 s; 62°C 30 s; 1 min. 30 s a 72°C) durante 30 ciclos. El producto PCR se clonó en un vector comercial pGEM-T(tm) easy.

##### Secuencia del par de cebador PCR

Xba I-*abfB*-1: > 5'-TCTAGAATGTTTCCAAGAATAAAACCAG-3'<  
Hind III-*abfB*-1: > 5'-AAGCTTTCATGCAAAGGCAGTCT-3'<

El fragmento Hind III/Xba I de 1534 bp se escindió del vector pGEM-T y se subclonó en los sitios Hind III/Xba I en un vector lanzadera pJL 52 (plac195-PGK/CYC1). Para la expresión heteróloga, el gen *abfB* se encuentra por lo tanto bajo la dependencia del promotor constitutivo *PGK* del gen que codifica para la fosfo-glicerato quinasa (*S. cerevisiae*) y del terminador *CYC1* (*S. cerevisiae*) del gen que codifica para una actividad citocrómica C oxidasa. El nuevo casete de expresión se denomina pOT-01.

La cepa *S. cerevisiae* JF #1194 (CEN.PK113-5D), clon procedente de la cepa CEN.PK 122 que contiene la auxotrofia *ura 3-52*, se transformó (método con litio acetato/choque térmico) por el vector de expresión pOT-01. Las cepas transformantes se seleccionaron por complementación fenotípica sobre cajas selectivas sin uracilo (marcador *URA3*).

Se seleccionaron seis transformantes para ensayar la presencia de una actividad arabinofuranosidasa B en el sobrenadante de cultivo. Los transformantes se cultivaron en 50 ml de medio YNB sin uracilo (salvo la cepa control salvaje) durante 24 horas. Se dosificó la actividad arabinofuranosidasa sobre los sobrenadantes de cultivo con la ayuda del método descrito en el párrafo anterior.

#### Determinación del pH óptimo

El gen *abfB-1* que codifica para una actividad arabinofuranosidasa B procedente de *P. funiculosum* se clonó en *S. cerevisiae*. Después de la verificación de la presencia de una actividad arabinofuranosidasa B en varios transformantes, se seleccionó un transformante y se dosificó la actividad ABFB sobre el sobrenadante de cultivo después de 24 h de crecimiento. Los cultivos se han realizado en erlen de 200 ml (Vu 50 ml). La actividad se determinó en presencia de 5 mM de p-nitrofenil- $\alpha$ -L-arabinofuranosida (PNPAF) en una serie de tampón Mc Ilvaine (pH 2,2 a 8,0). Se incubaron 80  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo con 320  $\mu$ l de sustrato precalentado a 40°C durante 10 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 1 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. La liberación del p-nitrofenil se mide a 405  $\text{nm}^{-1}$ . Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de PNPAF por minuto en las condiciones definidas anteriormente. La curva de actividad está representada en la figura 1. Para ABFB-1, la actividad óptima se sitúa a pH 3,4 y la enzima conserva el 65% de actividad a pH 5.

#### Determinación de la temperatura óptima

Según el mismo protocolo, se determinó la temperatura óptima de actividad de ABFB-1. La enzima se incubó durante 10 minutos a cada una de las temperaturas en un tampón Mc Ilvaine a pH 3,4. La curva de actividad está presentada en la figura 2. La ABFB-1 de *P. funiculosum* presenta una actividad óptima a 60°C. La ABFB-1 presenta por lo tanto una temperatura óptima superior a las ABFB descritas. Situándose a los pH y a las temperaturas óptimas de la enzima ABFB-1 (pH 3,4 y 60°C), se observa que la actividad para ABFB-1 es 4 veces superior a la actividad determinada en un tampón acetato pH 5 y 40°C (424 mU frente a 102 mU).

#### Determinación de $K_m$ y $V_m$

Las constantes cinéticas ( $K_m$  y  $V_m$ ) de ABFB-1 se determinaron mediante la medición de la hidrólisis de PNPAF a lo largo del tiempo, en las condiciones óptimas determinadas anteriormente.

Las gamas de concentración en sustrato (PNPAF) se han establecido entre 0,5 y 5 mM en un tampón pH 3,4. La cinética de hidrólisis se siguió durante 10 minutos a 60°C. Los resultados se trataron según el método de las dobles inversas (Lineweaver y Burk) y están presentados en la figura 3.

El valor de  $K_m$  es de 1 mM para ABFB-1. Por comparación en la bibliografía, los valores de  $K_m$  para este tipo de enzima varía de 0,05 a 1,2 mM según el género y la especie fúngica estudiada. La ABFB-1 presenta una velocidad de hidrólisis máxima ( $V_m$ ) de 521 moles PNPAF/mol de enzima/min. en las condiciones descritas anteriormente.

#### Determinación del peso molecular de la enzima ABFB-1

Con el fin de determinar el peso molecular de la enzima ABFB-1, el sobrenadante de cultivo, procedente del crecimiento en medio mínimo de un mutante (*S. cerevisiae*), se concentró 200 veces, se desnaturalizó por ebullición a 100°C durante 5 minutos, y después se depositó en un gel de poliacrilamida-SDS.

Se observa que la cantidad de proteínas extracelulares es extremadamente baja en la cepa salvaje. Para los mutantes, la enzima ABFB-1 está segregada en el sobrenadante de cultivo. Es mayoritaria con respecto al nivel basal de las proteínas extracelulares de *S. cerevisiae*.

La determinación del peso molecular se efectuó con la ayuda del marcador de tamaño SeeBlue (Invitrogen). Los resultados se presentan en la tabla 1.

	PM predicho	PM estimado sobre gel
ABFB-1	53	65

Tabla 1: Peso molecular ABFB-1 en KDa

5 Se ha comparado el peso molecular predicho por el algoritmo de vector NTi y el peso obtenido por migración electroforética en un gel desnaturizante SDS-PAGE. Se observa una sobrestimación del peso molecular de la enzima en el gel SAS-PAGE. Una fuerte glicosilación de la enzima está sugerida en efecto por la visualización sobre gel de una banda electroforética difusa (O y N glicosilaciones). Estas glicosilaciones aparecen durante la maduración de las proteínas en el organismo de expresión.

10 Análisis del perfil de expresión del gen *abfB-1* en *Penicillium funiculosum*

*Penicillium funiculosum* posee dos genes que codifican para unas  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B: los genes *abfB-1* y *abfB-2*. Se han comparado los perfiles de expresión de estos genes en diferentes condiciones de cultivo de *P. funiculosum*.

15 *P. funiculosum* se cultivó en unas condiciones de inducción de enzimas celulolíticas y hemi-celulolíticas (medio de crecimiento industrial de tipo M2) y en unas condiciones de no producción (medio mínimo glucosa MO). Después de 40 h de crecimiento, se pararon los cultivos, se recuperó el micelio y se extrajeron los ARN totales. La cantidad y la calidad de los ARN se apreciaron mediante medición de la absorbancia a 260 nm y a 280 nm (ratio 260/280 > 1,8).  
20 El nivel de transcritos que codifican para las actividades arabinofuranosidasas de tipo B (ABFB-1 y ABFB-2) se cuantificó en cada una de las dos condiciones (M0 y M2) mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

Se utilizó el gen que codifica para la tubulina (*tub-1*) de *P. funiculosum* como control en las dos condiciones. Este gen codifica para una proteína de estructura indispensable para la integridad de la célula. Este gen se utiliza de manera habitual como gen de referencia, ya que presenta un nivel de expresión constante, sea cual sea la condición de cultivo utilizada (ubiquitaria).  
25

Se han diseñado unos cebadores específicos para la PCR cuantitativa para cada uno de los genes (*abfB-1*, *abfB-2*, y *tub-1*). Para las dos condiciones de crecimiento (M0 y M2), se han retro-transcrito 2  $\mu$ g de ARN totales. Se ha realizado una serie de dilución de los ADN complementarios procedentes de la retro-transcripción con el fin de determinar las condiciones óptimas de amplificación de los genes diana (limitaciones del método de PCR cuantitativa y para la eficacia de estos pares de cebadores).  
30

Los resultados normalizados se presentan en la tabla 2 y la figura 4.  
35

	M0	M2
abfb 1	1	107
abfb 2	1	1,27

Tabla 2: valores de expresión diferencial de los genes *abfB-1* y *abfB-2* en función de las condiciones de crecimiento de *P. funiculosum*.

40 Se han descrito las regulaciones transcripcionales de los genes que codifican para unas actividades celulolíticas y hemi-celulolíticas. La expresión de estos genes está sometida en gran medida a la naturaleza y/o a la complejidad de la fuente de carbono y de nitrógeno sobre la cual se cultiva el microorganismo. Se ha reportado una fuerte represión transcripcional de estos genes en presencia de glucosa. Esta regulación se efectúa por medio de una proteína de represión catabólica CreA que se fija específicamente sobre el promotor de estos genes y bloquea su  
45 transcripción. En el presente experimento de cuantificación por PCR de los mensajeros *abfB-1* y *abfB-2*, el nivel de expresión de estos 2 genes en la condición glucosa (M0) es muy bajo. Esto está en acuerdo con la bibliografía ya que se ha demostrado que estos genes presentan un nivel basal de expresión incluso en unas condiciones no favorables (ausencia de sustratos celulolíticos y/o hemi-celulolíticos). Los resultados obtenidos para la condición M0 están en acuerdo con la bibliografía. En lo que se refiere a la expresión del gen *abfB-1*, se constata un factor de inducción de 107 veces superior al nivel basal obtenido en la condición M0, mientras que el gen *abfB-2* no está sobreexpresado.  
50

**Listado de secuencias**

55 <110> ADISSEO FRANCE SAS

<120> Gen *abfb-1* de *Penicillium funiculosum*

<130> KH/SG/BR048786

60

<140>  
 <141>  
  
 <160> 4  
 5 <170> PatentIn Ver. 2.1  
  
 <210> 1  
 <211> 3107  
 10 <212> ADN  
 <213> *Penicillium funiculosum*  
  
 <220>  
 <221> promotor  
 15 <222 > (1)..(844)  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (212)..(216)  
 20 <223> Sitio creA  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (403)..(408)  
 25 <223> Sitio pacC  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (559)..(564)  
 30 <223> Sitio creA  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (616)..(620)  
 35 <223> Sitio AlcR  
  
 <220>  
 <221> Señal TATA  
 <222> (739)..(742)  
 40  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (845)..(2368)  
 45  
 <220>  
 <221> terminador  
 <222> (2369)..(3107)  
  
 <220>  
 <221> Señal polyA  
 <222> (2460)..(2465)  
 50  
  
 <220>  
 <221> señal\_péptido  
 <222> (845)..(926)  
 55  
  
 <400> 1

ES 2 406 415 T3

```

agtgattgat cattacagtc ggcaaaaacg gtccgtttat ccccggatga gcatgcgega 60
agttgattag attgcaatcg gataaattgc attgcatgac tacgtgcctc ggcaaagatg 120
gacctcatcg agtgtatgag ctccggcattc aagtttaaag agtaatttaa ccttggggat 180
caaggacaag gctttttaag cttatatgcg aggatccggg gccccagggg gccatgactc 240
ctcaacattc tgtttcaatt ggccaattgc cctcctgag accctataac acgcgcgctt 300
ttcttctcct cttgggcaag cttagttgtg ctcaaatcgc tgtacctgaa ttaggcaggt 360
actcggcact cacacctatg atatcgtggc ctgggtctaac ttgccaggaa atcgggaattt 420
tcagactett tttcttgccg atttgggatc aatcctaatt ttagttgcat caaggtaata 480
aacggaacac tttgttccac ctctgatgct cgtgagaaat agccttacac gcgtcacaag 540
gcttttgttt atgcaacgct ggagagggac agcctcgttt ttctccacgt tttttcaaat 600
tcttctgaat gcaccccgca taacggtaat tagcattagc attgatatgea tatcgagttt 660
gtaattattg gagggatttc atgccacctg agtaaaatga gccggctctga atctggttct 720
cggtagtttg aaaatgatta taaaagatag gtttcggctt gaaacgtgct ctgcttcagt 780
agtcgattaa gcctctcctc gatcatctta tagtcacagg cgtgctcgtc tagcaaaagt 840
catc atg ttt cca aga ata aaa cca gaa cgc acc agc ctg ttc gcc ctt . 889
  Met Phe Pro Arg Ile Lys Pro Glu Arg Thr Ser Leu Phe Ala Leu
    1           5           10          15
ggc ctt ctt gcc tgc agc tcc ctt gtc acc gca act ggg cct tgc gat 937
Gly Leu Leu Ala Ser Ser Leu Val Thr Ala Thr Gly Pro Cys Asp
    20          25          30
atc tac tcc tcc ggc ggt acg cct tgc gtt gcc gcg cac agc acc acc 985
Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Thr Pro Cys Val Ala Ala His Ser Thr Thr
    35          40          45
cgt gcc ctt tat gcc tct tac agc ggc gca ctc tac cag gtc aag cgg 1033
Arg Ala Leu Tyr Ala Ser Tyr Ser Gly Ala Leu Tyr Gln Val Lys Arg
    50          55          60
ggc tcc gac ggt gct aca acc acc atc tgc ccg ctt tcc gca ggt ggt 1081
Gly Ser Asp Gly Ala Thr Thr Thr Ile Ser Pro Leu Ser Ala Gly Gly
    65          70          75
gtc gcc aac gct gcc gcc caa gat acc ttc tgt gcc aac acg acc tgc 1129
Val Ala Asn Ala Ala Ala Gln Asp Thr Phe Cys Ala Asn Thr Thr Cys
    80          85          90          95
ctc atc acg atc atc tac gac caa tcc ggc cgc ggt aac cat ctc acc 1177
Leu Ile Thr Ile Ile Tyr Asp Gln Ser Gly Arg Gly Asn His Leu Thr
    100         105         110
cag gct ccc ccc ggt ggc ttc gat ggc cct gac gtc aat ggc tat gat 1225
Gln Ala Pro Pro Gly Gly Phe Asp Gly Pro Asp Val Asn Gly Tyr Asp
    115         120         125

```

ES 2 406 415 T3

aac ttg gct ggc gcg att ggc gca ccc gtc act ctg aac ggt cag aag 1273  
 Asn Leu Ala Gly Ala Ile Gly Ala Pro Val Thr Leu Asn Gly Gln Lys  
 130 135 140

ggc tac ggt gtc ttc atc tca cct ggt acc ggc tac cgt aac aac gct 1321  
 Ala Tyr Gly Val Phe Ile Ser Pro Gly Thr Gly Tyr Arg Asn Asn Ala  
 145 150 155

gcc agc ggc aca gct acc ggt gac gca gcg gag ggc atg tat gca gtg 1369  
 Ala Ser Gly Thr Ala Thr Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Tyr Ala Val  
 160 165 170 175

ctc gac gga act cac tac aac ggc gcg tgc tgc ttc gat tat ggc aat 1417  
 Leu Asp Gly Thr His Tyr Asn Gly Ala Cys Cys Phe Asp Tyr Gly Asn  
 180 185 190

gcc gag acc agc agc act gat act ggc aat ggc cac atg gag gct atc 1465  
 Ala Glu Thr Ser Ser Thr Asp Thr Gly Asn Gly His Met Glu Ala Ile  
 195 200 205

tac tat ggt gac gcc acc tac tgg gga agt ggc tcc ggc agc ggg cca 1513  
 Tyr Tyr Gly Asp Ala Thr Tyr Trp Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Pro  
 210 215 220

tgg gtc atg gct gat ctt gag aac ggt ctg ttc tct ggt gag agc act 1561  
 Trp Val Met Ala Asp Leu Glu Asn Gly Leu Phe Ser Gly Glu Ser Thr  
 225 230 235

ggc gtg aac tct gcc gac ccg tct ctc tct tac cgc ttc gtc act gcg 1609  
 Gly Val Asn Ser Ala Asp Pro Ser Leu Ser Tyr Arg Phe Val Thr Ala  
 240 245 250 255

gtc gtc aag ggt gag cca aat ttc tgg gct att cgc ggt ggt aac gct 1657  
 Val Val Lys Gly Glu Pro Asn Phe Trp Ala Ile Arg Gly Gly Asn Ala  
 260 265 270

gca tcc ggt tct ttg tcc acg tac tac agt ggg gtg cgc cca caa gta 1705  
 Ala Ser Gly Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Ser Gly Val Arg Pro Gln Val  
 275 280 285

tct ggc tat tac ccc atg cac aaa gaa ggt gcc atc att ctc ggc att 1753  
 Ser Gly Tyr Tyr Pro Met His Lys Glu Gly Ala Ile Ile Leu Gly Ile  
 290 295 300

ggt ggt gat aac agc aac ggc gcc cag ggc acg ttc tac gaa ggt gtc 1801  
 Gly Gly Asp Asn Ser Asn Gly Ala Gln Gly Thr Phe Tyr Glu Gly Val  
 305 310 315

atg acc tcc gga tat cca aca gac gcc acc gag aac tca gtg cag gct 1849  
 Met Thr Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ala Thr Glu Asn Ser Val Gln Ala  
 320 325 330 335

aac atc gta gct gcc aaa tac gct acc acg tcg ttg acc agt ggt ccg 1897  
 Asn Ile Val Ala Ala Lys Tyr Ala Thr Thr Ser Leu Thr Ser Gly Pro  
 340 345 350

gca ctc aca gtc ggc tcc gct att tcg ttg cat gtc acc act gcc gga 1945  
 Ala Leu Thr Val Gly Ser Ala Ile Ser Leu His Val Thr Thr Ala Gly  
 355 360 365

tac acg aca cgc tat atc gca cac aac gac acc acc gtc aac acc cag 1993  
 Tyr Thr Thr Arg Tyr Ile Ala His Asn Asp Thr Thr Val Asn Thr Gln

ES 2 406 415 T3

	370		375			380		
	gtc gtc tca tcg tcc agc tct acc act ctc aaa gag caa gct agc tgg		tct acc act ctc aaa gag caa gct agc tgg					2041
	Val Val Ser Ser Ser Ser Ser Thr Thr Leu Lys Glu Gln Ala Ser Trp		Thr Thr Thr Ser Ala Cys Phe Ser Phe Glu Ser					
	385		390			395		
	acg gtt cgc acc ggt ctt ggc aac agc gcc tgt ttc tcg ttt gag tcc		gtt ggc aac agc gcc tgt ttc tcg ttt gag tcc					2089
	Thr Val Arg Thr Gly Leu Gly Asn Ser Ala Cys Phe Ser Phe Glu Ser		Thr Val Arg Thr Gly Leu Gly Asn Ser Ala Cys Phe Ser Phe Glu Ser					
	400		405			410		415
	gtt gac acc ccc ggc agc tac att cgt cac tac aac ttc gag ctc ctg		gtt gac acc ccc ggc agc tac att cgt cac tac aac ttc gag ctc ctg					2137
	Val Asp Thr Pro Gly Ser Tyr Ile Arg His Tyr Asn Phe Glu Leu Leu		Val Asp Thr Pro Gly Ser Tyr Ile Arg His Tyr Asn Phe Glu Leu Leu					
			420			425		430
	ctc aat gct aat gat ggc acc aag cag ttc cat gaa gat gcc aca ttc		ctc aat gct aat gat ggc acc aag cag ttc cat gaa gat gcc aca ttc					2185
	Leu Asn Ala Asn Asp Gly Thr Lys Gln Phe His Glu Asp Ala Thr Phe		Leu Asn Ala Asn Asp Gly Thr Lys Gln Phe His Glu Asp Ala Thr Phe					
			435			440		445
	tgc ccg cag tct ggc ctt agc ggc acg ggt acc tcg ctt cga agc tgg		tgc ccg cag tct ggc ctt agc ggc acg ggt acc tcg ctt cga agc tgg					2233
	Cys Pro Gln Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gly Thr Ser Leu Arg Ser Trp		Cys Pro Gln Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gly Thr Ser Leu Arg Ser Trp					
			450			455		460
	agc tat ccc acc cgc tat ttc cga cac tat aat aac gta ttg tat gct		agc tat ccc acc cgc tat ttc cga cac tat aat aac gta ttg tat gct					2281
	Ser Tyr Pro Thr Arg Tyr Phe Arg His Tyr Asn Asn Val Leu Tyr Ala		Ser Tyr Pro Thr Arg Tyr Phe Arg His Tyr Asn Asn Val Leu Tyr Ala					
			465			470		475
	gcc agc aac ggc ggc gtg caa acg ttt gat gcc acc gct tcc ttc aac		gcc agc aac ggc ggc gtg caa acg ttt gat gcc acc gct tcc ttc aac					2329
	Ala Ser Asn Gly Gly Val Gln Thr Phe Asp Ala Thr Ala Ser Phe Asn		Ala Ser Asn Gly Gly Val Gln Thr Phe Asp Ala Thr Ala Ser Phe Asn					
			480			485		490
	gcc gat gtg acc ttc ttg gtc gag act gcc ttt gca tga ttcttgacct		gcc gat gtg acc ttc ttg gtc gag act gcc ttt gca tga ttcttgacct					2378
	Ala Asp Val Thr Phe Leu Val Glu Thr Ala Phe Ala		Ala Asp Val Thr Phe Leu Val Glu Thr Ala Phe Ala					
			500			505		
	agcctcgtga aggtctaggt gtatggtaga accttgtag tgtatccttg gcacgattcg		agcctcgtga aggtctaggt gtatggtaga accttgtag tgtatccttg gcacgattcg					2438
	ttttaaatat aggcagattt aaataaactg atgattacaa agaagacttg gcttacctgt		ttttaaatat aggcagattt aaataaactg atgattacaa agaagacttg gcttacctgt					2498
	tagtaactat ctcaaagatg aagttgctgt ttgttgtagg aagatgccct gcatgcaaac		tagtaactat ctcaaagatg aagttgctgt ttgttgtagg aagatgccct gcatgcaaac					2558
	aaaacaaact tcttgggcga tgaaggctcac gtgactcgta gccggatttg attacctgtt		aaaacaaact tcttgggcga tgaaggctcac gtgactcgta gccggatttg attacctgtt					2618
	tgggaaacat tcacgccaac aactccgagg caatagtcag gcttgcaacg ataccaaaga		tgggaaacat tcacgccaac aactccgagg caatagtcag gcttgcaacg ataccaaaga					2678
	gaaagagaaa cggaggtttg tataagagaa atattgteta gcaaaactgac agtgactcat		gaaagagaaa cggaggtttg tataagagaa atattgteta gcaaaactgac agtgactcat					2738
	tccaccaaaa tgtatgtatg agttggccat gctctaagag ttctgttagg gcaaccactg		tccaccaaaa tgtatgtatg agttggccat gctctaagag ttctgttagg gcaaccactg					2798
	gctctaattg gctgcccggc ggcttctctc cacggaccog ccctccagat gatcgtagca		gctctaattg gctgcccggc ggcttctctc cacggaccog ccctccagat gatcgtagca					2858
	agttgccgcc gattaatttg ccagccacct tccctcttcc tctcagggtc tgtctgtctg		agttgccgcc gattaatttg ccagccacct tccctcttcc tctcagggtc tgtctgtctg					2918
	tgttcgctgt tgttcctcct gccattcccc tctgctccca ttcggctctgt catcttttga		tgttcgctgt tgttcctcct gccattcccc tctgctccca ttcggctctgt catcttttga					2978
	ataccctttg aatattcttc gcgcacactg agtgcgccca ttattgtatt attatcgact		ataccctttg aatattcttc gcgcacactg agtgcgccca ttattgtatt attatcgact					3038
	ttgtcgtctc ttctcagact ttctcgtgtt tttttgggt cttcgttatg ggtattccgt		ttgtcgtctc ttctcagact ttctcgtgtt tttttgggt cttcgttatg ggtattccgt					3098
	aagttgatc							3107

5 <210> 2  
 <211> 507  
 <212> PRT  
 <213> *Penicillium funiculosum*

10 <400> 2

ES 2 406 415 T3

Met Phe Pro Arg Ile Lys Pro Glu Arg Thr Ser Leu Phe Ala Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Ala Ser Ser Leu Val Thr Ala Thr Gly Pro Cys Asp Ile  
 20 25 30  
 Tyr Ser Ser Gly Gly Thr Pro Cys Val Ala Ala His Ser Thr Thr Arg  
 35 40 45  
 Ala Leu Tyr Ala Ser Tyr Ser Gly Ala Leu Tyr Gln Val Lys Arg Gly  
 50 55 60  
 Ser Asp Gly Ala Thr Thr Thr Ile Ser Pro Leu Ser Ala Gly Gly Val  
 65 70 75 80  
 Ala Asn Ala Ala Ala Gln Asp Thr Phe Cys Ala Asn Thr Thr Cys Leu  
 85 90 95  
 Ile Thr Ile Ile Tyr Asp Gln Ser Gly Arg Gly Asn His Leu Thr Gln  
 100 105 110  
 Ala Pro Pro Gly Gly Phe Asp Gly Pro Asp Val Asn Gly Tyr Asp Asn  
 115 120 125  
 Leu Ala Gly Ala Ile Gly Ala Pro Val Thr Leu Asn Gly Gln Lys Ala  
 130 135 140  
 Tyr Gly Val Phe Ile Ser Pro Gly Thr Gly Tyr Arg Asn Asn Ala Ala  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Thr Ala Thr Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Tyr Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Asp Gly Thr His Tyr Asn Gly Ala Cys Cys Phe Asp Tyr Gly Asn Ala  
 180 185 190  
 Glu Thr Ser Ser Thr Asp Thr Gly Asn Gly His Met Glu Ala Ile Tyr  
 195 200 205  
 Tyr Gly Asp Ala Thr Tyr Trp Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Pro Trp  
 210 215 220  
 Val Met Ala Asp Leu Glu Asn Gly Leu Phe Ser Gly Glu Ser Thr Gly  
 225 230 235 240  
 Val Asn Ser Ala Asp Pro Ser Leu Ser Tyr Arg Phe Val Thr Ala Val  
 245 250 255  
 Val Lys Gly Glu Pro Asn Phe Trp Ala Ile Arg Gly Gly Asn Ala Ala  
 260 265 270  
 Ser Gly Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Ser Gly Val Arg Pro Gln Val Ser  
 275 280 285  
 Gly Tyr Tyr Pro Met His Lys Glu Gly Ala Ile Ile Leu Gly Ile Gly  
 290 295 300  
 Gly Asp Asn Ser Asn Gly Ala Gln Gly Thr Phe Tyr Glu Gly Val Met  
 305 310 315 320  
 Thr Ser Gly Tyr Pro Thr Asp Ala Thr Glu Asn Ser Val Gln Ala Asn  
 325 330 335  
 Ile Val Ala Ala Lys Tyr Ala Thr Thr Ser Leu Thr Ser Gly Pro Ala  
 340 345 350  
 Leu Thr Val Gly Ser Ala Ile Ser Leu His Val Thr Thr Ala Gly Tyr  
 355 360 365  
 Thr Thr Arg Tyr Ile Ala His Asn Asp Thr Thr Val Asn Thr Gln Val  
 370 375 380  
 Val Ser Ser Ser Ser Ser Thr Thr Leu Lys Glu Gln Ala Ser Trp Thr  
 385 390 395 400  
 Val Arg Thr Gly Leu Gly Asn Ser Ala Cys Phe Ser Phe Glu Ser Val  
 405 410 415  
 Asp Thr Pro Gly Ser Tyr Ile Arg His Tyr Asn Phe Glu Leu Leu Leu  
 420 425 430  
 Asn Ala Asn Asp Gly Thr Lys Gln Phe His Glu Asp Ala Thr Phe Cys  
 435 440 445  
 Pro Gln Ser Gly Leu Ser Gly Thr Gly Thr Ser Leu Arg Ser Trp Ser  
 450 455 460  
 Tyr Pro Thr Arg Tyr Phe Arg His Tyr Asn Asn Val Leu Tyr Ala Ala  
 465 470 475 480  
 Ser Asn Gly Gly Val Gln Thr Phe Asp Ala Thr Ala Ser Phe Asn Ala  
 485 490 495  
 Asp Val Thr Phe Leu Val Glu Thr Ala Phe Ala  
 500 505

<210> 3  
 5 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador Xbal-abfB

<400> 3

tctagaatgt ttccaagaat aaaaccag

# ES 2 406 415 T3

<210> 4

<211> 23

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador HindIII-abfB

<400> 4

10

aagcttcat gcaaggcag tct

23

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Polipéptido adaptado a la utilización en nutrición animal, caracterizado porque comprende un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos siguientes:
- el polipéptido de la SEC ID nº 2,
  - el polipéptido maduro cuya secuencia está comprendida entre la posición 28 y la posición 507 de la SEC ID nº 2.
- 10 2. Polinucleótido que codifica para una actividad  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa B, caracterizado porque se selecciona de entre los polinucleótidos siguientes:
- el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 845 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1,
  - el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 926 y la posición 2368 de la SEC ID nº 1.
- 15 3. Polinucleótido caracterizado porque tiene la secuencia de la SEC ID nº 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID nº 1.
- 20 4. Casete de expresión, caracterizado porque comprende en el sentido de la transcripción:
- un promotor funcional en un organismo hospedante;
  - un polinucleótido según la reivindicación 2; y
  - una secuencia terminadora en el mismo organismo hospedante.
- 25 5. Vector que comprende un polinucleótido según una de las reivindicaciones 2 a 3 y/o un casete de expresión según la reivindicación 4.
- 30 6. Organismo hospedante transformado con un polinucleótido según una de las reivindicaciones 2 a 3, un casete de expresión según la reivindicación 4 y/o un vector según la reivindicación 5.
7. Organismo hospedante según la reivindicación 6, caracterizado porque el organismo hospedante se selecciona de entre las levaduras y los hongos filamentosos.
- 35 8. Organismo hospedante según la reivindicación 7, caracterizado porque se trata de una cepa de *Penicillium funiculosum*.
9. Aditivo nutricional para animales, caracterizado porque comprende un polipéptido según la reivindicación 1.
- 40 10. Aditivo nutricional para animales, caracterizado porque comprende un organismo hospedante según una de las reivindicaciones 6 a 8 y/o un mosto de fermentación de un organismo hospedante según una de las reivindicaciones 6 a 8.
- 45 11. Aditivo nutricional para animales según una de las reivindicaciones 9 a 10, caracterizado porque se presenta en forma líquida o en forma de polvo.
12. Alimento para animales, caracterizado porque comprende una base nutricional para animales y un aditivo nutricional para animales según una de las reivindicaciones 9 a 11.
- 50 13. Utilización de un polipéptido según la reivindicación 1 o de un organismo hospedante según una de las reivindicaciones 6 a 8 para la fabricación de un aditivo nutricional para animales o de un alimento para animales.
- 55 14. Utilización de un polipéptido según la reivindicación 1 o de un organismo hospedante según una de las reivindicaciones 6 a 8 para la hidrólisis de los enlaces  $\alpha$ -L-arabinofuranosilo de los compuestos arabinofuranosil-oligosacáridos.

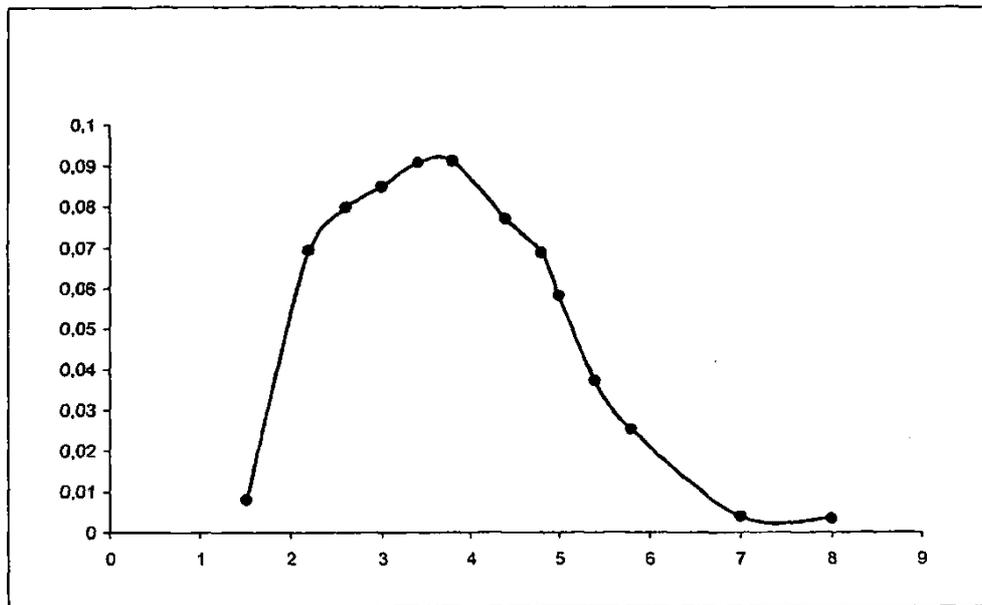


Fig. 1

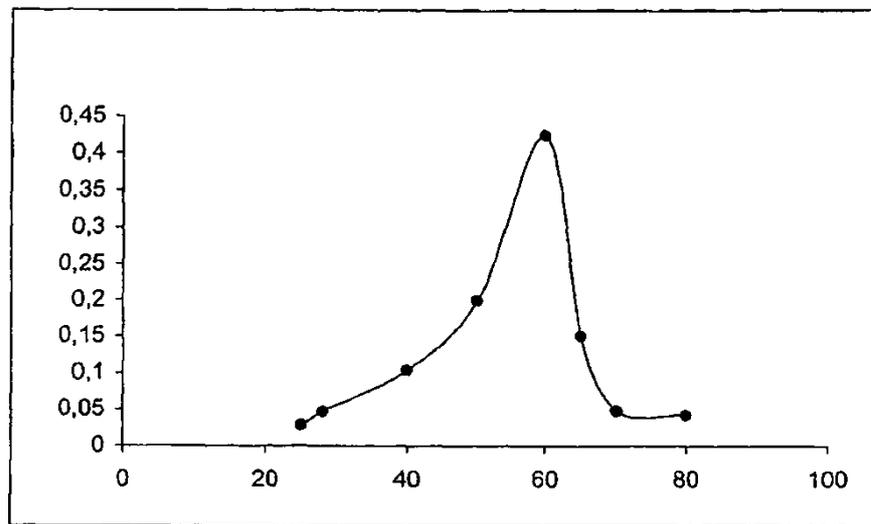


Fig. 2

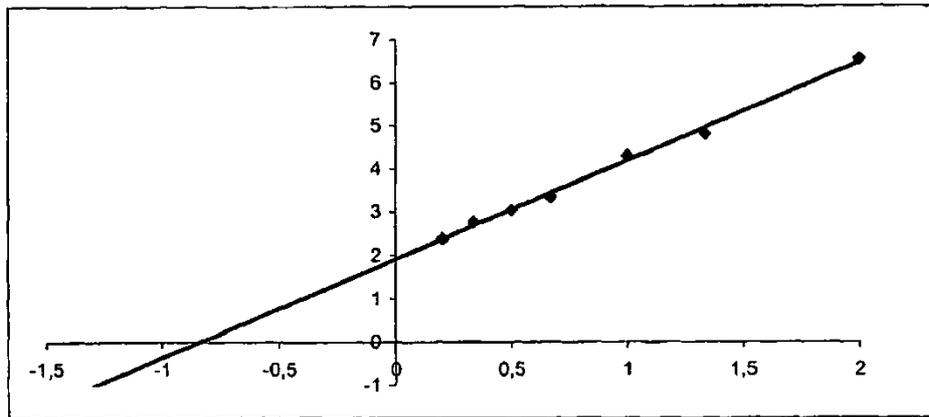


Fig. 3

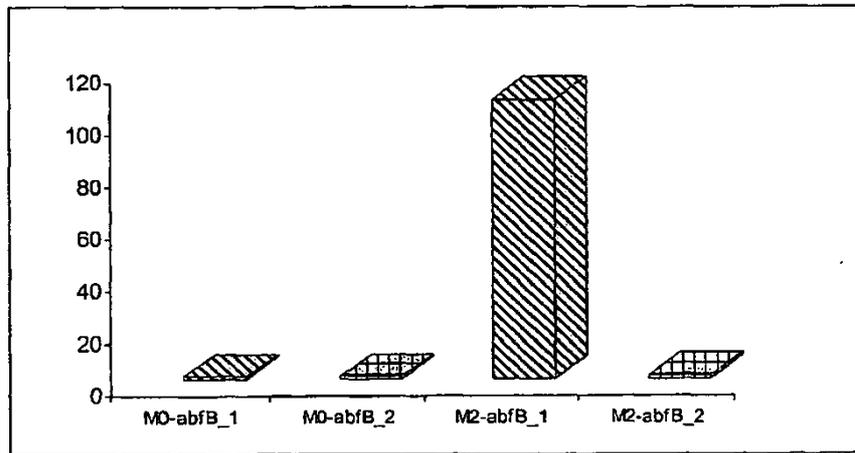


Fig. 4