

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 538**

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 06764593 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1877560**

54 Título: **Gen ABFB-2 de Penicillium funiculosum**

30 Prioridad:

04.05.2005 FR 0504560

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

12.05.2015

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 2 535 538 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-2 de *Penicillium funiculosum*.

- 5 La invención se refiere al gen *afbB-2* aislado de *Penicillium funiculosum* y al polipéptido ABFB-2 codificado por este gen que tiene una actividad α -L-arabinofuranosidasa B.

10 *Penicillium funiculosum* es un Talaromices que pertenece a la familia de los *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 de este modo 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 limitado de actividades enzimáticas como las xilanasas, las β -glucanasas se miden generalmente sobre los mostos de fermentación obtenidos. Estas actividades no reflejan más que una porción de la población enzimática presente en el cóctel.

20 Los compuestos hemicelulolíticos 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 gran 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 arabinoxilanos. El arabinano es un polímero de residuos arabinofuranosa unidos por enlaces α -1-5 y puede estar sustituido por 1 o 2 residuos arabinosa en posición O-2 u O-3. Con respecto a los arabinoxilanos, los residuos α -L-arabinofuranosilo están unidos a la cadena principal β -1-4-xilopiranosilo mediante unos enlaces α -1-3 y α -1-2. La presencia de residuos arabinosa en estas cadenas laterales puede restringir la hidrólisis enzimática de los compuestos hemicelulolíticos en numerosas aplicaciones industriales tales como la mejora de la digestibilidad de la alimentación animal. Las enzimas que cortan los enlaces α -L-arabinofuranosídicos pueden actuar de forma sinérgica con las xilanasas para permitir la hidrólisis de los arabinoxilanos y arabinanos.

35 Las actividades arabinasas (endo-, exoarabinasas y mayoritariamente las actividades α -L-arabinofuranosidasas) pueden por lo tanto contribuir activamente y de forma sinérgica con la xilanasas a la despolimerización de los compuestos hemicelulolíticos. Los compuestos hemicelulolíticos y pécticos pueden representar hasta un 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 los compuestos hemicelulolíticos (Brice, R.E., Morrison, I.M. 1982, *Carbohydr. Res.* 101 : 93-100).

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

45 Las α -L-arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55) se han clasificado en dos familias de glucósido hidrolasas (GH 51 y GH 54) según sus similitudes de secuencia proteica. Estas dos familias difieren en su especificidad de sustrato contenido en los polisacáridos. El primer grupo (GH 51) contiene las arabinofuranosidasas de tipo A que actúan solamente sobre estructuras pequeñas lineales de oligosacáridos arabinofuranosilo unidos en α -1-5. El segundo grupo está constituido por arabinofuranosidasas de tipo B (GH 54) que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,5; α -1,3 y α -1,2 de las cadenas laterales contenidas en los compuestos oligosacáridos de arabinofuranosilo.

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

55 Los documentos WO 96/29416, WO 96/06935 y US nº 5.989.887 describen unos genes de arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger*.

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

Los documentos WO 96/29416, WO 96/06935, 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 *afbB* de *A. niger* es 50,9% idéntica a la proteína ABFB-2 de *P. funiculosum*. No está descrita ninguna de las características esenciales de la utilización del polipéptido en nutrición animal en estas solicitudes.

65 Clinche *et al.* (J. Agric. Food Chem., 45, 2379-2383, 1997) han descrito tres α -L-arabinofuranosidasas procedentes

de *Aspergillus terreus* que tienen una aplicación potencial en enología.

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 aplicaciones en la fermentación del licor japonés *shochu*.

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.* también han descrito dos alfa-L-arabinofuranosidasas extracelulares procedentes de *Fusarium oxysporum*. (*Can J Microbiol.* 2003 : 49(10):639-4).

Carvalho *et al.* (*Mycol. Res.*, 107 (4), 388-394, 2003) han descrito la α -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium purpurogenum*. La alineación de secuencias indica que la proteína *abf-1* de *P. purpurogenum* es 51,2% idéntica a la proteína ABFB-2 de *P. funiculosum*. No está descrita ninguna de las características esenciales de la utilización del polipéptido en nutrición animal en este artículo.

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.

Sin embargo, estas enzimas ABFB no tienen las calidades óptimas requeridas para una aplicación en 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 bajo las condiciones de temperatura y de pH de los procedimientos, y si es posible, ser óptimas en la preparación de estos alimentos así como bajo las condiciones presentes en el sistema digestivo de los animales que ingieren estos alimentos.

Además, estas enzimas deben tener un amplio espectro de acción (desramaje) sobre los heteropolisacáridos (arabinanos, 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. De este modo, las enzimas que tienen una especificidad (estereoespecificidad, enantioselectividad), una actividad o una afinidad mejorada sobre los sustratos naturales arabinoxilanos y arabinanos presentan un gran interés para la alimentación animal.

Además, antes de la hidrólisis de los enlaces arabinofuranosilo, es indispensable despolimerizar previamente las moléculas complejas tales como la celulosa. Las enzimas celulolíticas (celulasas) de hongo poseen en general un dominio fCDB (dominio de fijación a la celulosa de tipo fúngico) que juega un papel preponderante en esta despolimerización de la celulosa.

La presente invención describe una L-arabinofuranosidasa B (ABFB-2) de *Penicillium funiculosum*, adaptada para una aplicación en la nutrición animal, así como el gen que codifica para esta enzima. La invención se refiere también a los homólogos, las variantes y los fragmentos de ABFB-2 que conservan las mismas propiedades catalíticas.

Ventajosamente, las enzimas ABFB según la invención presentan un pH óptimo muy ácido (pH 2,6) y conservan 55% de su actividad a pH 1,5.

Ventajosamente, la enzima ABFB-2 posee un dominio de fijación a la celulosa de tipo fúngico (fCBD). Este tipo de dominio ha sido descrito en otras enzimas pero no se había descrito nunca para una arabinofuranosidasa fúngica. La funcionalidad de este dominio de fijación a la celulosa de la enzima ABFB-2 de *Penicillium funiculosum* ha podido ser verificada experimentalmente. La presencia de este dominio de fijación incrementa la afinidad de la enzima para su sustrato y permite por consiguiente mejorar la degradación de la celulosa insoluble.

De este modo, gracias a sus propiedades catalíticas y a su afinidad por la celulosa, la ABFB-2 de *Penicillium funiculosum* está pues particularmente adaptada a una aplicación en alimentación animal en particular.

Las enzimas según la invención tienen sin embargo otras aplicaciones industriales o agroindustriales. Se citan en particular el tratamiento de zumo de frutas, la fabricación de papel, la conversión de biomásas hemicelulósicas en carburantes o productos químicos, la preparación de bebidas alcohólicas por fermentación.

Descripción de las secuencias

SEC ID nº 1: Secuencia genómica del gen *abfB-2* de *Penicillium funiculosum*.

SEC ID nº 2: Secuencia del polipéptido ABFB-2 de *Penicillium funiculosum* que tiene una actividad α -L-

arabinofuranosidasa de tipo B.

SEC ID nº 3: Dominio fCBD de la ABFB-2 de *Penicillium funiculosum*.

5 SEC ID nº 4: Dominio de baja complejidad de la ABFB-2 de *Penicillium funiculosum*.

SEC ID nº 5: Dominio fCBD de la cianomilo esterasa de *Penicillium funiculosum*.

10 SEC ID nº 6: Dominio fCBD de la endo1-4 xilanasa D de *Penicillium funiculosum*.

SEC ID nº 7: Dominio fCBD de la xilanasa celobiohidrolasa de *Penicillium funiculosum*.

SEC ID nº 8: Cebador de PCR XbaI-abfB-2

15 SEC ID nº 9: Cebador de PCR HindIII-abfB-2.

Descripción de la invención

20 La presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos siguientes:

- el polipéptido de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido cuya secuencia está comprendida entre la posición 28 y la posición 400 de la SEC ID nº 2,
- 25 - un fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 que tiene una actividad α -L-arabinofuranosidasa B,
- un polipéptido que tiene una actividad α -L-arabinofuranosidasa B y que presenta por lo menos un 80% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2.

30 La invención se refiere también a un polinucleótido que codifica para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B, seleccionado de entre los polinucleótidos siguientes:

- 35 - el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 268 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1,
- el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 349 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1,
- 40 - un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la reivindicación 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.

45 La invención también se refiere a casetes de expresión que comprenden en el sentido de la transcripción:

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

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

55 La invención se refiere también a un organismo hospedador transformado con un polinucleótido según la invención, un casete de expresión según la invención y/o un vector según la invención.

En una forma de realización de la invención, el organismo hospedador se selecciona de entre las levaduras y los hongos filamentosos.

60 Preferentemente, el organismo hospedador 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 hospedador según la invención o un mosto de fermentación de un organismo hospedador según la invención.

65 Preferentemente, este aditivo nutricional se presenta en forma de líquido 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.

5 La invención también se refiere a la utilización de un polipéptido ABFB según la invención o de un organismo hospedador según la invención para la fabricación de un aditivo nutricional para animales o de un alimento para animales.

10 Otro objeto de la invención es la utilización de un polipéptido ABFB según la invención o de un organismo hospedador según la invención para la hidrólisis de los enlaces α -L-arabinofuranosilo de los compuestos oligosacáridos de arabinofuranosilo.

Polipéptidos

15 La presente invención se refiere por lo tanto a polipéptidos ABFB que tienen una actividad α -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, estos polipéptidos se aíslan a partir de *Penicillium funiculosum*.

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

Los polipéptidos de la presente invención están adaptados a la utilización en nutrición animal.

25 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 cuales la enzima es activa. 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, esto 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 un alimento del animal implica unos tratamientos y una temperatura superiores a la
30 temperatura ambiente. La actividad de las enzimas utilizadas debe por lo tanto ser estable bajo las condiciones de los procedimientos, en particular las condiciones de temperaturas.

35 Según una forma de realización de la presente invención, el polipéptido presenta una actividad α -L-arabinofuranosidasa a un pH ácido, por ejemplo inferior a 4,5, preferentemente inferior a 4. Asimismo, según una forma de realización de la presente invención, el polipéptido presenta una actividad α -L-arabinofuranosidasa óptima entre pH 1,5 y pH 3,5.

40 Según una forma de realización preferida de la presente invención, el polipéptido presenta una actividad α -L-arabinofuranosidasa a temperaturas superiores a la temperatura ambiente. Preferentemente, el polipéptido de la presente invención posee una actividad α -L-arabinofuranosidasa óptima a una temperatura comprendida entre 30°C y 70°C, más preferentemente entre 40°C y 60°C.

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

50 En una forma de realización preferida, los polipéptidos según la presente invención están glicosilados. El polipéptido de la SEC ID nº 2 posee en particular unos sitios de N-glicosilación sobre el aminoácido 123 y sobre el aminoácido 127. En una forma de realización preferida, los residuos de asparagina en posición 123 y 127 del polipéptido de la SEC ID nº 2 están glicosilados.

55 La α -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum* es una enzima secretada por el hongo a su ambiente extracelular. El polipéptido de la SEC ID nº 2 comprende de este modo 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 400 de la SEC ID nº 2. En otra forma de realización, el péptido señal del polipéptido de la SEC ID nº 2 puede ser reemplazado por un péptido señal heterólogo para la expresión y la secreción del polipéptido de la SEC ID nº 2 por un organismo hospedador heterólogo.

60 La invención se refiere asimismo a fragmentos del polipéptido de la SEC ID nº 2 que tienen una actividad α -L-arabinofuranosidasa B.

65 El término "fragmento" de un polipéptido designa un polipéptido que comprende una parte pero no la totalidad del polipéptido del cual deriva. La invención se refiere también de este modo a un polipéptido que comprende un fragmento de por lo menos 100, 200 o 300 aminoácidos del polipéptido de la SEC ID nº 2.

Este fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 conserva su actividad α -L-arabinofuranosidasa. 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” se refiere a un fragmento del polipéptido que conserva la función del polipéptido del cual deriva. Los fragmentos biológicamente activos del polipéptido de la SEC ID nº 2 conservan de este modo la función del polipéptido ABFB-2 de *Penicillium funiculosum*. Estos fragmentos biológicamente activos tienen una actividad de
- 5 α -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, los fragmentos de la ABFB según la invención poseen un dominio de fijación a la celulosa. En una forma de realización preferida, el dominio de fijación a la celulosa tiene la secuencia descrita en la SEC ID nº 3. Preferentemente, estos fragmentos presentan una actividad α -L-arabinofuranosidasa óptima a pH 2,6.
- 10 Los métodos de preparación de fragmentos de un polipéptido así como las técnicas de medición de la actividad α -L-arabinofuranosidasa B son bien conocidos por el experto en la materia.
- La invención tiene también por objeto unos polipéptidos que tienen una actividad L-arabinofuranosidasa B y que presentan por lo menos un 90% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2. Preferentemente, estos
- 15 polipéptidos tienen las mismas propiedades y, en particular, las mismas propiedades catalíticas que los polipéptidos de la SEC ID nº 2. Preferentemente, estos polipéptidos están se aíslan de otras cepas de *Penicillium funiculosum* o de otros hongos filamentosos. Alternativamente, estos polipéptidos pueden ser obtenidos mediante técnicas de mutagénesis dirigida por ejemplo.
- 20 La invención tiene por objeto los polipéptidos que presentan por lo menos 80%, 90%, 95%, 98% y preferentemente por lo menos 99% de aminoácidos idénticos con el polipéptido de la SEC ID nº 2.
- Se entiende por aminoácidos idénticos, unos aminoácidos invariantes o no cambiados entre dos secuencias. Estos polipéptidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con
- 25 respecto al polipéptido de la SEC ID nº 2.
- La invención tiene asimismo por objeto los polipéptidos que presentan por lo menos 90%, 95%, 98% y preferentemente por lo menos 99% de similitud con el polipéptido de la SEC ID nº 2.
- 30 Se entiende por similitud, la medición de la semejanza entre secuencias proteicas o nucleicas. Estos polipéptidos pueden presentar una delección una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polipéptido de la SEC ID nº 2. El grado de similitud entre dos secuencias, cuantificado por una puntuación, se basa en el porcentaje de identidad y/o de sustituciones conservadoras de las secuencias.
- 35 Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de similitud entre polipéptidos son conocidos por el experto en la materia. Se puede emplear por ejemplo Vector NTi 9.1.0, programa de alineación AlignX (algoritmo Clustal W) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>). Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto.
- 40 Los polipéptidos según la invención se aíslan o se purifican de su ambiente natural. Los polipéptidos se pueden preparar mediante diferentes procedimientos. Estos procedimientos son, en particular, la purificación a partir de fuentes naturales tales como células que expresan naturalmente estos polipéptidos, la producción de polipéptidos recombinantes por parte de células hospedadoras apropiadas y su purificación posterior, la producción por síntesis química o, por último, una combinación de estas diferentes aproximaciones. Estos diferentes procedimientos de
- 45 producción son bien conocidos por el experto en la materia. De este modo, los polipéptidos ABFB de la presente invención pueden ser aislados a partir de *Penicillium funiculosum*. En otra forma de realización, los polipéptidos ABFB de la presente invención se aíslan a partir de organismos hospedadores recombinantes que expresan un polipéptido ABFB según la invención.
- 50 La invención tiene asimismo por objeto proteínas de fusión, proteínas recombinantes o proteínas híbridas que comprenden los polipéptidos según la invención. El término “polipéptido” se refiere tanto a proteínas como a polipéptidos modificados.
- Los polipéptidos según la presente invención tienen una actividad ABFB. Preferentemente, los polipéptidos según la
- 55 invención poseen un dominio de fijación a la celulosa. En una forma de realización preferida, el dominio de fijación a la celulosa tiene la secuencia descrita en la SEC ID nº 3. Preferentemente, los polipéptidos presentan una actividad α -L-arabinofuranosidasa óptima a pH 2,6. Preferentemente, los polipéptidos presentan una actividad α -L-arabinofuranosidasa B óptima a 50°C.
- 60 Polinucleótidos
- La invención se refiere también a polinucleótidos que codifican para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, estos polinucleótidos codifican para una α -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum*.
- 65 Según la presente invención, se entiende por “polinucleótido” una cadena nucleotídica de hebra simple o su complementaria de ADN o ARN, o una cadena nucleotídica de doble hebra pudiendo ser de tipo ADN

complementario o genómico. Preferentemente, los polinucleótidos de la invención son de tipo ADN, en particular de ADN de doble hebra. El término "polinucleótido" se refiere asimismo a los polinucleótidos modificados.

Los polinucleótidos de la presente invención se aíslan o se purifican de su ambiente natural. Preferentemente, los polinucleótidos de la presente invención se pueden preparar mediante las técnicas clásicas de biología molecular tales como las descritas por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989) o por síntesis química.

En una primera forma de realización, la invención se refiere al polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 268 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1. Este polinucleótido codifica para la enzima ABFB-2 de la SEC ID nº 2 de *Penicillium funiculosum*.

En una segunda forma de realización, la invención se refiere al polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 349 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1. Este polinucleótido codifica para el polipéptido maduro de ABFB-2 de *Penicillium funiculosum* después de la escisión del péptido señal.

La invención se refiere también a polinucleótidos que presentan por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% y preferentemente 99% de identidad con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 268 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1 y/o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 349 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1. Estos polinucleótidos codifican para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, estos polinucleótidos codifican para una α -L- arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum*.

Se entiende por nucleótidos idénticos, nucleótidos invariantes o no cambiados entre dos secuencias. Estos polinucleótidos pueden presentar una delección, una adición o una sustitución de por lo menos un nucleótido con respecto al polinucleótido de referencia.

La invención se refiere también a polinucleótidos que presentan por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% y preferentemente por lo menos 99% de similitud con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 268 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1 y/o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 349 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1. Estos polinucleótidos codifican para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B. Preferentemente, estos polinucleótidos codifican para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum*.

Se entiende por similitud, la medición de la semejanza entre secuencias proteicas o nucleicas. Estos polinucleótidos pueden presentar una delección una adición o una sustitución de por lo menos un aminoácido con respecto al polinucleótido de referencia. El grado de similitud entre dos secuencias, cuantificado por una puntuación, se basa en el porcentaje de identidad y/o de sustituciones conservadoras de las secuencias.

Los métodos de medición y de identificación del grado de identidad y del grado de similitud entre las secuencias de ácidos nucleicos son bien conocidos por el experto en la materia. Se puede emplear por ejemplo Vector NTi 9.1.0, programa de alineación AlignX (algoritmo Clustal W) (Invitrogen INFORMAX, <http://www.invitrogen.com>). Preferentemente, se utilizan los parámetros por defecto.

Preferentemente, los polinucleótidos que presentan un grado de similitud con un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia. En el caso presente, los polinucleótidos codifican para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B.

La invención se refiere también a polinucleótidos capaces de hibridarse de forma selectiva con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 268 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1 y/o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 349 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1. Preferentemente, la hibridación selectiva se efectúa bajo condiciones medianamente astringentes, y preferentemente bajo condiciones fuertemente astringentes. Estos polinucleótidos codifican para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B de *Penicillium funiculosum*.

Se entiende por "secuencia capaz de hibridarse de forma selectiva" según la invención, secuencias que se hibridan con la secuencia de referencia a un nivel superior al ruido de fondo de forma significativa. El nivel de señal generado por la interacción entre la secuencia capaz de hibridarse de forma selectiva y las secuencias de referencia es generalmente 10 veces, preferentemente 100 veces más intenso que el de la interacción de las otras 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 siguiente tampón: 6X SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% Ficoll, 0,02% BSA, 500 µg/ml ADN de esperma de salmón desnaturalizado. Los lavados se realizan por ejemplo sucesivamente con astringencia baja en un tampón 2X SSC, 0,1% SDS, con astringencia media en un tampón 0,5X SSC, 0,1% SDS y con astringencia alta en un tampón 0,1X SSC, 0,1% SDS. Obviamente, la hibridación se puede realizar mediante

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 forma selectiva con un polinucleótido de referencia conservan la función de la secuencia de referencia. En el caso presente, los polinucleótidos que se hibridan de forma selectiva con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 268 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1 y/o con el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 249 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1 codifican para una actividad α -L-arabinofuranosidasa B.

La invención se refiere de forma general a los polinucleótidos que codifican para los polipéptidos según la invención. Debido a la degeneración 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 secuencias que flanquean el marco abierto de lectura (ORF) del gen *abfB-2* de *Penicillium funiculosum*. El gen *abfB* puede ser expresado a partir de sus secuencias reguladoras homólogas en particular para una sobreexpresión en *Penicillium funiculosum* o en otros hongos filamentosos.

En otra forma de realización, el gen *abfB* puede ser expresado en diferentes organismos hospedadores tales como las bacterias, las levaduras y los hongos por ejemplo. El gen *abfB* puede ser expresado en un organismo hospedador 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 una forma de realización de la invención, un polinucleótido que codifica para un polipéptido según la invención se inserta en un casete de expresión utilizando 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 a la vez unos elementos que permiten la producción de un polipéptido por una célula hospedadora y unos elementos necesarios para la regulación de esta expresión.

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

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

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 hospedador elegido para la expresión del gen de interés. Algunos promotores permiten una expresión constitutiva mientras que otros promotores son por el contrario inducibles. De entre los promotores funcionales en los hongos, se citará en particular el de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Aspergillus nidulans* (Roberts *et al.* *Current Genet.* 15:177-180, 1989). De entre los promotores funcionales en las bacterias, se citará en particular el de la ARN polimerasa del bacteriofago T7 (Studier *et al.* *Methods in enzymology* 185:60-89, 1990). De entre los promotores funcionales en las levaduras, se citarán 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.

Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se elegirán por ejemplo casetes de expresión que comprenden un promotor histona H4.B, un promotor ácido aspártico proteasa o un promotor *csi13* (WO 00/68401).

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 hospedador. 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 activadores de la transcripción ("potenciadores").

Una gran variedad de secuencias terminadoras se pueden utilizar 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 hospedador seleccionado.

Para la expresión en *Penicillium funiculosum*, se elegirán por ejemplo unos casetes de expresión que comprenden un terminador histona H4.B, un terminador ácido aspártico proteasa o un terminador *csi13* (WO 99/68401).

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

5 La presente invención se refiere asimismo a vectores de replicación o de expresión para la transformación de un organismo hospedador que comprenden por lo menos un polinucleótido o un casete de expresión según la presente invención. Este vector puede en particular corresponder a un plásmido, un cósmido, un bacteriófago o un virus en el cual 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 forma general, se puede utilizar cualquier vector capaz de mantenerse, de autoreplicarse o de propagarse en una célula hospedadora con el fin de inducir en particular la expresión de un polinucleótido o de un polipéptido. El experto en la materia elegirá los vectores adecuados en función del organismo hospedador que se deba transformar y en función de la técnica de transformación puesta en práctica.

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

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

- transformar un organismo hospedador con un vector de expresión que comprende un casete de expresión según la invención y/o con un polinucleótido según la invención,
- 25 - aislar los polipéptidos producidos por el organismo hospedador.

Organismos hospedadores

30 La presente invención tiene asimismo por objeto un procedimiento de transformación de un organismo hospedador mediante la integración en dicho organismo hospedador de por lo menos un polinucleótido o de un casete de expresión o de un vector según la invención. El polinucleótido puede integrarse en el genoma del organismo hospedador o replicarse de forma estable en el organismo hospedador. Los métodos de transformación de los organismos hospedadores son bien conocidos por el experto en la materia y están ampliamente descritos en la bibliografía.

35 La presente invención se refiere asimismo a un organismo hospedador transformado con un polinucleótido, un casete de expresión o un vector según la invención. Se entiende por organismo hospedador, en particular en el seno de la invención, cualquier organismo mono o pluricelular, inferior o superior, en particular elegido de entre las bacterias, las levaduras y los hongos. Por un organismo hospedador se entiende un organismo no humano. De forma ventajosa, las levaduras se eligen de entre *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* y *Schwanniomyces occidentalis*. Los hongos se eligen 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 forma de realización preferida, el organismo hospedador es una cepa de *Penicillium funiculosum* en la que se expresa o sobreexpresa un polipéptido ABFB según la invención.

40 Las técnicas de construcción de vectores, de transformación de organismos hospedadores 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 -Intersciences, 1989; T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook, *Molecular Cloning: A laboratory Handbook*, 1982).

Aditivos alimentarios y alimentos para animales

50 La presente invención se refiere por lo tanto a aditivos alimentarios que aportan una actividad α -L-arabinofuranosidasa B. El aporte de este tipo de actividad enzimática permite mejorar la digestibilidad del alimento y aumentar su valor nutricional.

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

60 Típicamente, los aditivos nutricionales para animales comprenden un polipéptido según la invención, un organismo hospedador según la invención o un mosto de fermentación de un organismo hospedador según la invención. De este modo, los polipéptidos que tienen una actividad α -L-arabinofuranosidasa B según la invención pueden ser purificados o aislados de una cepa de *Penicillium funiculosum* o de un organismo hospedador recombinante para la fabricación de un aditivo nutricional para animales. Alternativamente, una cepa de *Penicillium funiculosum* o un organismo hospedador que produce polipéptidos AbfB pueden ser utilizados directamente para la fabricación de un

aditivo nutricional para animales. En una forma de realización preferida de la invención, el sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación de una cepa de *Penicillium funiculosum* o de un organismo hospedador según la invención se utiliza para la fabricación de aditivos nutricionales para animales. Este modo de realización es particularmente ventajoso cuando los polipéptidos ABFB son secretados por la cepa de *Penicillium funiculosum* o el organismo hospedador. Habitualmente, este sobrenadante de cultivo se concentra o se liofiliza para la fabricación del aditivo nutricional.

De este modo, la invención se refiere también a un procedimiento de preparación de enzima ABFB que comprende las etapas siguientes:

- a) poner en cultivo una cepa de *Penicillium funiculosum* o de un organismo hospedador transformado según la invención en condiciones de inducción de la expresión de los ABFB.
- b) Separar el sobrenadante de cultivo que comprende la enzima ABFB.

A continuación, este sobrenadante de cultivo o mosto de fermentación se puede concentrar o liofilizar para la formulación de un aditivo alimentario o de un alimento para animales.

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

Los aditivos nutricionales de la presente invención comprenden una actividad α -L-arabinofuranosidasa B pero pueden comprender asimismo otras sustancias nutricionales como vitaminas, aminoácidos o sales minerales.

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

La presente invención se refiere también 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 granulados en los cuales se incorporan 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 hospedador según la invención o un mosto de fermentación de un organismo hospedador 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, aquello que constituye lo esencial de la ración alimentaria 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 para la alimentación de estos animales y son bien conocidas por el experto en la materia. Habitualmente, estas bases nutricionales comprenden por ejemplo maíz, trigo, guisantes y soja. Estas bases nutricionales están adaptadas a las necesidades de las diferentes especies de animales a las que están destinadas. Estas bases nutricionales pueden ya contener aditivos nutricionales como vitaminas, sales minerales y aminoácidos.

En una forma de realización preferida, la invención se refiere a alimentos para animales monogástricos y en particular para las aves de corral y para los cerdos. Las aves de corral comprenden en particular las gallinas ponedoras, los pollos de carne, los pavos y los patos. Los cerdos comprenden en particular los cerdos de crecimiento y de cebo así como los cochinitillos.

Descripción de las figuras

Figura 1: Esquema organizacional del dominio fúngico de fijación a la celulosa (fCBD).

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

Figura 3: Determinación de la temperatura óptima de la enzima ABFB-2 a su pH óptimo en presencia de 5 mM de PNPAF:

Figura 4: Determinación de las constantes cinéticas K_m y V_m ($1/V_i=f(1/S)$) para la ABFB-2 para una gama de PNPAF que va de 0,5 mM a 5 mM a pH 2,6 y 50°C.

Figura 5: Valores de expresión diferencial de los genes *abfB-1* y *abfB-2* en función de las condiciones de crecimiento de *P. funiculosum*.

5 Figura 6: Cinética de desaparición de la ABFB-2 en el sobrenadante de reacción. La adhesión de la enzima a la celulosa está seguida por la medición de la actividad α -L-arabinofuranosidasa B residual libre de ABFB-2.

Ejemplos

10 Análisis de la estructura del gen ABFB-2

La ABFB-2 presenta menos de 62% de identidad con otras enzimas ABFB de hongos filamentosos mientras que estas enzimas están en general muy conservadas. Esta diferencia de identidad se explica por la identificación de dos regiones distintas. En la parte N terminal una región específica de las arabinofuranosidasas (10 aa hasta 341 aa) y en la región C terminal un dominio de fijación a la celulosa de tipo fúngico fCBD (del inglés, fungal-type Cellulose-Binding Domain), que se ha predicho mediante un análisis SMART (Simple Modular Architecture Reseach Tool) entre la posición 367 y 400 aa. Según la bibliografía, este tipo de dominio de fijación se encuentra generalmente en las enzimas implicadas en la degradación de celulosa tales como las endoglucanasas (EC 3.2.1.4), celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) (exoglucanasas) o xilanasas (EC 3.2.1.8). Es la primera vez que se informa de un dominio CBD para una arabinofuranosidasa.

Desde un punto de vista estructural (secuencia primaria), las celulasas y las xilanasas están constituidas por dos dominios distintos, un dominio catalítico y un domino CBD unidos por una secuencia corta denominada de baja complejidad, rica en prolina y/o en aminoácidos hidroxilados (serina y treonina). Los dominios de fijación a la celulosa se han estudiado en un cierto número de celulasas fúngicas y se caracterizan por una secuencia que va hasta 36 aminoácidos, presente en el extremo N terminal (*cbh-II* o *egl2*) o C terminal de la proteína (*cbh-I*, *egl1* o *egl5*). Además, este tipo de dominio se caracteriza por la conservación de 4 cisteínas siguiendo la Figura 1 que permiten la formación de puentes disulfuro.

30 El dominio fCBD predicho para la ABFB-2 de *Penicillium funiculosum* está compuesto por 34 aminoácidos incluyendo las 4 cisteínas conservadas (THWGQCGGSGYSGPTSCVAPYACTTANPYAQCCL).

Este dominio está precedido de una secuencia corta de 23 aminoácidos de baja complejidad (STSPGSHTTSTTLTTITSTTAVS) característica, rica en aminoácidos que presentan un hidroxilo (10 treoninas y 6 serinas). En *Penicillium funiculosum*, este tipo de dominio ha sido descrito en tres otras enzimas, la endo-1,4-xilanasas, la celobiohidrolasa, y la ácido ferúlico esterasa (cianomilo esterasa). La alineación de estos cuatro dominios confirma la conservación y el posicionamiento de las 4 cisteínas en el seno de fCBD.

		496		529
	ABFB_2 <i>P.funiculosum</i>	(367)	THWGQCGGSGYSGPTSCVAPYACTTANPYAQCCL	
	cianonamil esterasa	(320)	AHWAQCGGI GYSQCTACASPYTCQKANDYYSQCL	
	Endo 1-4 Xilanasas D_P.f	(374)	AHWGQCGGIGWSPTEICVSPYTCQVLPNPYYSQCL	
	xilanasas celobiohidrolasa	(496)	AHWGQCGGQGWITGPTTCASGTTCTIVVNPYYSQCL	

40 Alineación de los fCBD conocidos en *Penicillium funiculosum*.

Este tipo de dominio de fijación ha sido ampliamente descrito para las enzimas celulolíticas (celulasas). El análisis de la secuencia primaria del fCBD mediante alineación blast, contra las secuencias fCBD conocidas, identifica una homología muy fuerte con los dominios de fijación a la celulosa de la celobiohidrolasa de tipo I y II, así como con los dominios de las endoglucanasas de tipo I, II y V procedentes de *Trichoderma reesei* y de *Aspergillus niger*. Los 3 residuos tirosina, así como los residuos asparagina y glutamina, identificados como esenciales para la funcionalidad del dominio, están conservados en el seno de la secuencia ABFB-2. Los estudios de relación estructura/función muestran que este tipo de dominio juega un papel principal en la despolimerización de la celulosa (Linder, M. & Teeri, T. T. (1997) The roles and function of cellulose-binding domains, *J. Biotechnol.* 57 15-8) aumentando la afinidad de unión de la enzima con su sustrato. En *T. reesei*, la celobiohidrolasa I (CBH I) en ausencia de su dominio fCBD exhibe una actividad catalítica conservada, pero la afinidad de unión de la enzima con la celulosa se ve fuertemente disminuida.

55 Es la primera vez que se identifica un dominio de fijación de este tipo en el seno de una arabinofuranosidasa de tipo B en un hongo filamentosos. La presencia de este dominio incrementa la afinidad de la enzima por su sustrato y por consiguiente permite mejorar la degradación de la celulosa insoluble.

Puesta a punto de la cuantificación de la actividad L-arabinofuranosidasa B

La actividad L-arabinofuranosidasa se midió a partir de un cultivo de *P. funiculosum* en medio M2 con una adición mixta compuesta por 0,15% de Provasoy y 0,3% de celulosa al cabo de 40h. Se realizaron tomas de muestras a 48h y 72h de cultivo. El cultivo se realizó en erlen de 200 ml con un volumen útil de 50 ml. La actividad se determinó por hidrólisis de 5 mM de para-nitrofenil-(L-arabinofuranósido (PNPAF) en un tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5. Se incubaron 50 µl de sobrenadante de cultivo con 250 µl de sustrato precalentado a 50°C durante 15 min. La reacción se paró mediante adición de NaOH 0,5 M. La liberación del p-nitrofenil (PNP) se midió a 405 nm con un coeficiente de extinción molar de 17000 M⁻¹·cm⁻¹. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de PNPAF por minuto bajo las condiciones descritas anteriormente. Para el cultivo de *P. funiculosum* se obtuvieron 20 mU·ml⁻¹ al cabo de 48h y 112 mU·ml⁻¹ después de 72h de cultivo. Estos resultados están acordes con la bibliografía, en efecto para *Aspergillus niger* se hallaron actividades del orden de 100 a 600 mU·ml⁻¹ según el inductor utilizado en el cultivo.

Clonación de la ORF *abfB-2* de *P. funiculosum* y transformación en *Saccharomyces cerevisiae*

A partir del ADN genómico de *P. funiculosum*, el gen *abfB-2* se amplificó por PCR mediante un par de cebadores (HindIII-*abfB-2* / Xba I-*abfB-2*). Se aplicaron las siguientes condiciones de PCR (94°C 30 seg.; 62°C 30 seg.; 1 min 30 seg. 72°C) durante 30 ciclos. El producto de PCR de 1215 pb se clonó en un vector comercial pGEM-T(tm) easy.

Secuencia del par de cebadores de PCR

Xba I- *abfB-2* : > 5'-TCTAGAATGACGTCCAAACATAGTT-3'<
Hind III- *abfB-2*: > 5'-AAGCTTCTAGAGACATTGAGCGTA- 3'<

El fragmento Hind III/Xba I se escindió del vector pGEM-T y se subclonó en un vector lanzadera (plac195-PGK/CYC1). Para la expresión heteróloga, el gen *abfB-2* se encuentra por lo tanto bajo la dependencia del promotor constitutivo *PGK* del gen que codifica para la fosfoglicerato quinasa (*S. cerevisiae*) y del terminador *CYC1* (*S. cerevisiae*) del gen que codifica para una actividad citocromo C oxidasa. El nuevo vector de expresión se denomina pOT-02.

La cepa *S. cerevisiae* JF #1194 (CEN.PK113-5D), clon procedente de la cepa CEN.PK 122 portadora de la auxotrofia *ura 3-52*, fue transformado (método de acetato de litio/choque térmico) por el vector de expresión pOT-02. Las cepas transformantes se seleccionaron por complementación fenotípica en placas selectivas sin uracilo (marcador *URA3*).

Se seleccionaron seis transformantes para probar la presencia de una actividad arabinofuranosidasa B en el sobrenadante de cultivo. Los transformantes se cultivaron en 50 ml de medio mínimo sin uracilo (a excepción de la cepa control salvaje) durante 24h. La actividad arabinofuranosidasa se cuantificó sobre los sobrenadantes de cultivo mediante el método descrito en el párrafo anterior.

Determinación del pH óptimo

El gen *abfB-2* que codifica para una actividad arabinofuranosidasa B procedente de *P. funiculosum* se clonó en *S. cerevisiae*. Después de verificar la presencia de una actividad arabinofuranosidasa B en varios transformantes, se eligió un transformante y se cuantificó la actividad ABFB sobre el sobrenadante de cultivo después de 24h de crecimiento. Los cultivos se realizaron en erlen de 200 ml (Vu 50 ml). La actividad se determinó en presencia de 5 mM de p-nitrofenil-α-L-arabinofuranósido (PNPAF) en una serie de tampón Mc Ilvaine (pH 2,2 a 8,0). Se incubaron 80 µl de sobrenadante de cultivo con 320 µl de sustrato precalentado a 40°C durante 10 min. La reacción se paró mediante la adición de 1 ml de Na₂CO₃ 1 M. La liberación del p-nitrofenil se midió a 405 nm⁻¹. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 µmol de PNPAF por min. La curva de actividad está representada en la Figura 2. La ABFB-2 tiene un óptimo de actividad a pH 2,6 y conserva 55% de su actividad a pH 3,8. Es la primera vez que se observa un pH óptimo tan bajo para una arabinofuranosidasa y que ésta presenta 68% de actividad a pH 1,5 en una solución de HCl 50 mM.

Determinación de la temperatura óptima

Según el mismo protocolo, se determinó la temperatura óptima de actividad de la ABFB-2. La enzima se incubó 10 min a cada una de las temperaturas en un tampón Mc Ilvaine a pH 2,6. La curva de actividad se presenta en la Figura 3.

La bibliografía describe una gama de temperaturas óptimas de las ABFB comprendida entre 40 y 60°C. La ABFB-2 de *P. funiculosum* presenta un óptimo de actividad a 50°C. A los pH y a las temperaturas óptimas de la enzima (pH 2,6 y 50°C) cabe destacar que la actividad de la ABFB-2 es 20 veces superior a la actividad determinada en un tampón acetato pH 5 y 40°C (305 mU vs 15 mU).

Determinación de K_m y V_m

Las constantes cinéticas (K_m y V_m) de la ABFB-2 se determinaron, cada una de las dos, mediante medición de la hidrólisis del PNPAF a lo largo del tiempo, bajo las condiciones óptimas determinadas anteriormente.

Las gamas de concentración de sustrato (PNPAF) se establecieron entre 0,5 y 5 mM en un tampón a pH 2,6. La cinética de hidrólisis se siguió durante 10 min a 50°C. Con el fin de obtener las constantes cinéticas de cada una de las enzimas, los resultados se trataron según el método de dobles inversos (Lineweaver y Burk) y se presentan en la Figura 4.

Las constantes cinéticas se determinaron mediante hidrólisis del PNPAF bajo las condiciones óptimas. El valor de K_m es de 0,7 mM para la ABFB-2. Por comparación con la bibliografía, los valores de K_m para este tipo de enzima varían entre 0,05 y 1,2 mM según el género y la especie fúngica estudiada. La ABFB-2 presenta una velocidad de hidrólisis máxima (V_m) de 328 moles PNPAF/mol de enzima/min, bajo las condiciones descritas anteriormente.

Determinación del peso molecular de la enzima ABFB-2

Con el fin de determinar el peso molecular de la enzima ABFB-2, el sobrenadante de cultivo, procedente del crecimiento en medio mínimo del mutante (*S. cerevisiae*) se concentró 200 veces, se desnaturizó por ebullición a 100°C durante 5 min y se depositó en un gel de SDS-poliacrilamida.

Se observa que la cantidad de proteínas extracelulares es extremadamente baja en la cepa salvaje. Para los mutantes, la enzima ABFB-2 se secreta en el sobrenadante de cultivo. Ésta es mayoritaria con respecto al nivel basal de las proteínas extracelulares de *S. cerevisiae*. Para la enzima ABFB-2, la banda electroforética obtenida es difusa, lo que sugiere una fuerte glicosilación de la enzima.

La determinación del peso molecular se efectuó mediante el marcador de tamaño SeeBlue (Invitrogen). Los resultados se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Peso molecular de ABFB-2 en kDa.

	PM predicho	PM estimado en gel
ABFB-2	41	55

Se comparó el peso molecular predicho por el algoritmo de Vector NTi y el peso molecular obtenido mediante migración electroforética en un gel desnaturizante SDS-PAGE. Se observa una sobreestimación del peso molecular de la enzima en el gel SDS-PAGE. En efecto, la visualización sobre gel de una banda electroforética difusa sugiere una fuerte glicosilación de la enzima (glicosilaciones O y N). Estas glicosilaciones ocurren durante la maduración de las proteínas en el organismo de expresión.

Análisis del perfil de expresión del gen *afbB* en *Penicillium funiculosum*

Penicillium funiculosum posee dos genes que codifican para α -L-arabinofuranosidasas B: los genes *afbB-1* y *afbB-2*. Se compararon los perfiles de expresión de estos genes bajo diferentes condiciones de cultivo de *P. funiculosum*.

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

El gen que codifica para la tubulina (*tub-1*) de *P. funiculosum* se utilizó como control bajo las dos condiciones. Este gen codifica para una proteína de estructura indispensable para la integridad de la célula. Este gen se utiliza de forma corriente como gen de referencia, ya que presenta un nivel de expresión constante sea cual sea la condición de cultivo utilizada (constitutivo).

Se diseñaron cebadores específicos para la PCR cuantitativa para cada uno de los genes (*afbB-1*, *afbB-2* y *tub-1*). Para las dos condiciones de crecimiento (M0 y M2), 2 μ g de ARN totales se retrotranscribieron. Se realizó una serie de diluciones de los ADN complementarios procedentes de la retrotranscripción con el fin de determinar las condiciones óptimas de amplificación de los genes diana (obligación del método de PCR cuantitativa y para la eficacia de estos pares de cebadores).

Los resultados normalizados se presentan en la Tabla 2 y en la Figura 5.

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

	M0	M2
abfb_1	1	107
abfb_2	1	1,27

5 Se han descrito las regulaciones transcripcionales de los genes que codifican para actividades celulolíticas y hemicelulolíticas. La expresión de estos genes está fuertemente sometida a la naturaleza y/o a la complejidad de la fuente de carbono y de nitrógeno sobre la cual el microorganismo se cultiva. Se ha informado de 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 transcripción. En el experimento de cuantificación por PCR de los mensajeros *abfB-1* y *abfB-2* de la presente solicitud, que el nivel de expresión de estos 2 genes bajo la condición glucosa (M0) es muy bajo. Esto está acorde con la bibliografía ya que se ha mostrado que estos genes presentan un nivel de expresión basal incluso en condiciones no favorables (ausencia de sustratos celulolíticos y/o hemicelulolíticos). Los resultados obtenidos para la condición M0 están acordes con la bibliografía. Contrariamente al gen *abfB-1*, la expresión del gen *abfB-2* no está inducida bajo las condiciones industriales. Esto sugiere que los cócteles enzimáticos producidos por *Penicillium funiculosum* podrían ser mejorados obteniendo la expresión de la ABFB-2 por el hongo bajo condiciones industriales o incluso añadiendo ABFB-2 exógeno al cóctel enzimático producido.

Determinación de la funcionalidad del fCBD

20 Para verificar la funcionalidad del dominio fCBD, se realizaron ensayos de fijación de la enzima ABFB-2 sobre celulosa microcristalina.

25 La enzima se mezcló volumen a volumen con un 0,5% de celulosa microcristalina en un tampón TrisHCl 100 mM, pH 7,5 a 4°C. La adhesión de la proteína se siguió mediante la medición de la actividad arabinofuranosidasa B residual en presencia de PNPAF bajo las condiciones de hidrólisis óptimas determinadas. Después de diferentes tiempos de contacto entre la enzima y la celulosa, la mezcla se centrifugó y se siguió la disminución de la concentración en proteína ABFB-2 mediante la medición de la actividad arabinofuranosidasa B en el sobrenadante. Los ensayos de fijación se efectuaron en presencia de una reacción control que contiene la enzima ABFB-2, bajo las mismas condiciones experimentales, pero en ausencia de celulosa microcristalina. Se efectuó un segundo control incubando la enzima ABFB-2 bajo las mismas condiciones de reacción en presencia de celulosa microcristalina. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.

35 Se constata por lo tanto que el dominio de fijación a la celulosa de tipo fúngico (fCBD) de la enzima ABFB-2 procedente de *P. funiculosum* es funcional. La adhesión de la enzima se siguió después de 10 y 45 minutos de puesta en contacto. Después de 10 min de incubación, 70% de la cantidad total de la enzima presente en el instante inicial se adhirió a la celulosa microcristalina. Al cabo de 45 minutos, el 80% de la totalidad de la enzima presente en la reacción se adhirió a la celulosa. Este dato da que pensar que el equilibrio de la reacción de contacto se ha alcanzado muy rápidamente y que la cinética de adhesión de la enzima sigue muy probablemente una ley cinética de orden 1 con respecto al sustrato en los 10 primeros minutos.

Listado de secuencias

45 <110> ADISSEO FRANCE SAS
 <120> Gen *abfB-2* de *Penicillium funiculosum*
 <130> KH/SG/BR049664
 50 <140>
 <141>
 <160> 9
 55 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1639
 <212> ADN
 60 <213> *Penicillium funiculosum*
 <220>
 <221> promotor

<222> (1) .. (267)

<220>
<221> TATA_señal
5 <222> (167)..(172)

<220>
<221> CDS
10 <222> (268)..(1470)

<220>
<221> péptido señal
<222> (268) .. (348)

15 <220>
<221> misc_unión
<222> (1366)..(1467)
<223> dominio de unión a celulosa fCBD

20 <220>
<221> misc_característica
<222> (1285)..(1353)
<223> Dominio de baja complejidad

25 <220>
<221> terminador
<222> (1471)..(1639)

30 <220>
<221> polyA_señal
<222> (1620)..(1625)

<400> 1

ES 2 535 538 T3

ttgtatagtc tcacaaaacg attcaac atg acg tcc aaa cat agt ttc gaa cga 294
Met Thr Ser Lys His Ser Phe Glu Arg
1 5

gcc gcc ata ctt gca ttg ggc ctt att gct acg agc tct ctt gtt gcc 342
Ala Gly Ile Leu Ala Leu Gly Leu Ile Ala Thr Ser Ser Leu Val Ala
10 15 20 25

gcc gcc cct, tgt gac atc tac tct tca ggt ggc aca cca tgc gtt gcc 390
Ala Gly Pro Cys Asp Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Thr Pro Cys Val Ala
30 35 40

gcg cac agt acc act cgc gca etc tat gat gct tat act ggc ccg cta 438
Ala His Ser Thr Thr Arg Ala Leu Tyr Asp Ala Tyr Thr Gly Pro Leu
45 50 55

tac caa gtg aca egg agt tct gat agc agc aag aaa gat atc gcg cca 486
Tyr Gln Val Thr Arg Ser Ser Asp Ser Ser Lys Lys Asp Ile Ala Pro
60 65 70

ttg gcc gcc ggc ggc gtt gct aat gct gcc acg caa gac tcc ttt tgt 534
Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala Asn Ala Ala Thr Gln Asp Ser Phe Cys
75 80 85

tca gga aca acc tgc etc ata tct atc atc tac gac caa tct gga aag 582
Ser Gly Thr Thr Cys Leu Ile Ser Ile Ile Tyr Asp Gln Ser Gly Lys
90 95 100 105

ggg aac cat etc acc caa gct ccg aaa ggt ggc tgg agt gga cct gga 630
Gly Asn His Leu Thr Gln Ala Pro Lys Gly Gly Trp Ser Gly Pro Gly
110 115 120

cca aat ggt tca gat aat tta tcc agt gcg acc gcc gcc cca atc tat 678
Pro Asn Gly Ser Asp Asn Leu Ser Ser Ala Thr Ala Ala Pro Ile Tyr
125 130 135

ctg aac gga caa aag gcg tac ggc gtg ttt att gca cct ggt gac gcc 726
Leu Asn Gly Gln Lys Ala Tyr Gly Val Phe Ile Ala Pro Gly Asp Gly
140 145 150

tac cgt aat gat aag act tct ggt ata gcc aca ggc gat caa ccc gag 774
Tyr Arg Asn Asp Lys Thr Ser Gly Ile Ala Thr Gly Asp Gln Pro Glu
155 160 165

gga atg tac gcc atc ttt gac gga acg cac tac aac ggc ggc tgc tgc 822
Gly Met Tyr Ala Ile Phe Asp Gly Thr His Tyr Asn Gly Gly Cys Cys
170 175 180 185

ttc gac tac ggt aat gct gaa acc agt ggt acc gat aca ggc gct gcc 870
Phe Asp Tyr Gly Asn Ala Glu Thr Ser Gly Thr Asp Thr Gly Ala Gly
190 195 200

cac atg gag gct atc tac ttc ggt aac tgt aat gtc tgg ggt tct ggt 918
His Met Glu Ala Ile Tyr Phe Gly Asn Cys Asn Val Trp Gly Ser Gly
205 210 215

tct gga tca ggc cct tgg att atg gct gat ttg gag aat ggt etc ttc 966
Ser Gly Ser Gly Pro Trp Ile Met Ala Asp Leu Glu Asn Gly Leu Phe
220 225 230

tcc ggt tat aac gcc aaa caa aac acc gcc gat gca tcc atc aac tgg 1014
Ser Gly Tyr Asn Ala Lys Gln Asn Thr Ala Asp Ala Ser Ile Asn Trp
235 240 245

ES 2 535 538 T3

cga ttc gtc act gca att gtg aag ggc gag cca aac aat tgg gca atc 1062
 Arg Phe Val Thr Ala Ile Val Lys Gly Glu Pro Asn Asn Trp Ala Ile
 250 255 260 265

cgt ggt ggc aat gcc caa tct ggt tct ctc tcg aca tac tat aat ggc 1110
 Arg Gly Gly Asn Ala Gln Ser Gly Ser Leu Ser Thr Tyr Tyr Asn Gly
 270 275 280

ata cgc cca tca ggc tac aat ccg atg cac aaa gaa ggc gcc att atc 1158
 Ile Arg Pro Ser Gly Tyr Asn Pro Met His Lys Glu Gly Ala Ile Ile
 285 290 295

ctc ggc acg ggt ggt gac aac agt aac ggt gct caa ggc act ttt tac 1206
 Leu Gly Thr Gly Gly Asp Asn Ser Asn Gly Ala Gln Gly Thr Phe Tyr
 300 305 310

gag ggt gtg atg act tct ggg tac cct tct gac tca act gag aat tcc 1254
 Glu Gly Val Met Thr Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Ser Thr Glu Asn Ser
 315 320 325

gtt caa gcc aat atc gtt gcc gcc ggt tat tcc act tcg cct ggt agc 1302
 Val Gln Ala Asn Ile Val Ala Ala Gly Tyr Ser Thr Ser Pro Gly Ser
 330 335 340 345

cac acc act tcc acc acc ctt acc acc atc act agt acc aca gca gta 1350
 His Thr Thr Ser Thr Thr Leu Thr Thr Ile Thr Ser Thr Thr Ala Val
 350 355 360

tct gga gct ggc cag aca cac tgg ggt cag tgt gga ggt agc gga tac 1398
 Ser Gly Ala Gly Gln Thr His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Ser Gly Tyr
 365 370 375

tcc ggt cca acg agc tgt gtt gca ccc tac gct tgt aca acc gct aac 1446
 Ser Gly Pro Thr Ser Cys Val Ala Pro Tyr Ala Cys Thr Thr Ala Asn
 380 385 390

cct tac tac gct caa tgt ctc tag aatataggcg ctcatctggt ctatgactga 1500
 Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Leu
 395 400

agttggacaa gtatcaaaag ctctctggag gcagggagtg tatttttgat gattataaccg 1560

tctggagaaa gtgtatatag cttctcataa cccagacaat cagatatttc taacagagca 1620

ataaatgaga gatgatcaa 1639

<210> 2
 <211> 400
 5 <212> PRT
 <213> Penicillium funiculosum

<400> 2

Met Thr Ser Lys His Ser Phe Glu Arg Ala Gly Ile Leu Ala Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ile Ala Thr Ser Ser Leu Val Ala Ala Gly Pro Cys Asp Ile Tyr
 20 25 30
 Ser Ser Gly Gly Thr Pro Cys Val Ala Ala His Ser Thr Thr Arg Ala
 35 40 45
 Leu Tyr Asp Ala Tyr Thr Gly Pro Leu Tyr Gln Val Thr Arg Ser Ser
 50 55 60
 10 Asp Ser Ser Lys Lys Asp Ile Ala Pro Leu Ala Ala Gly Gly Val Ala

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido caracterizado por que comprende un polipéptido seleccionado de entre los polipéptidos siguientes:
- 5 - el polipéptido de la SEC ID nº 2,
- el polipéptido cuya secuencia está comprendida entre la posición 28 y la posición 400 de la SEC ID nº 2,
- un fragmento del polipéptido de la SEC ID nº 2 que tiene una actividad α -L-arabinofuranosidasa B,
- 10 - un polipéptido que tiene una actividad α -L-arabinofuranosidasa B y que presenta por lo menos 80% de identidad con el polipéptido de la SEC ID nº 2.
2. Polinucleótido que codifica una actividad α -L-arabinofuranosidasa B, caracterizado por que se selecciona de entre los polinucleótidos siguientes:
- 15 - el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 268 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1,
- el polinucleótido cuya secuencia está comprendida entre la posición 349 y la posición 1470 de la SEC ID nº 1
- un polinucleótido que codifica un polipéptido según la reivindicación 1.
- 25 3. Polinucleótido caracterizado por que presenta la secuencia de la SEC ID nº 1 o la secuencia complementaria a la SEC ID nº 1.
4. Casete de expresión, caracterizado por que comprende en el sentido de la transcripción:
- 30 - un promotor funcional en un organismo hospedador;
- un polinucleótido según la reivindicación 2; y
- una secuencia terminadora en el mismo organismo hospedador.
5. Vector que comprende un polinucleótido según una de las reivindicaciones 2 a 3 y/o un casete de expresión según la reivindicación 4.
- 35 6. Organismo hospedador no humano 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.
- 40 7. Organismo hospedador según la reivindicación 6, caracterizado por que el organismo hospedador se selecciona de entre las levaduras y los hongos filamentosos.
8. Organismo hospedador según la reivindicación 7, caracterizado por que se trata de una cepa de *Penicillium funiculosum*.
- 45 9. Aditivo nutricional para animales, caracterizado por que comprende un polipéptido según la reivindicación 1.
10. Aditivo nutricional para animales, caracterizado por que comprende un organismo hospedador según una de las reivindicaciones 6 a 8 y/o un mosto de fermentación de un organismo hospedador según una de las reivindicaciones 6 a 8.
- 50 11. Aditivo nutricional para animales según una de las reivindicaciones 9 a 10, caracterizado por que se presenta en forma líquida o en forma de polvo.
- 55 12. Alimento para animales, caracterizado por que comprende una base nutricional para animales y un aditivo nutricional para animales según una de las reivindicaciones 9 a 11.
13. Utilización de un polipéptido según la reivindicación 1 o de un organismo hospedador según una de las reivindicaciones 6 a 8 para la preparación de un aditivo nutricional para animales o de un alimento para animales.
- 60 14. Utilización de un polipéptido según la reivindicación 1 o de un organismo hospedador según una de las reivindicaciones 6 a 8 para la hidrólisis de los enlaces α -L-arabinofuranosilo de los compuestos oligosacáridos de arabinofuranosilo.

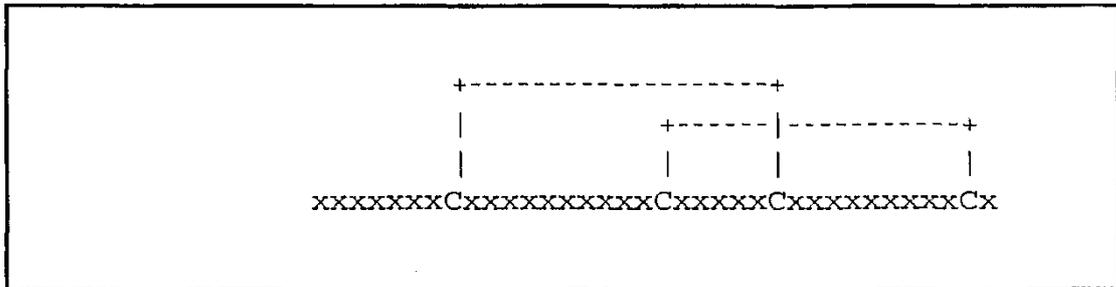


Fig. 1

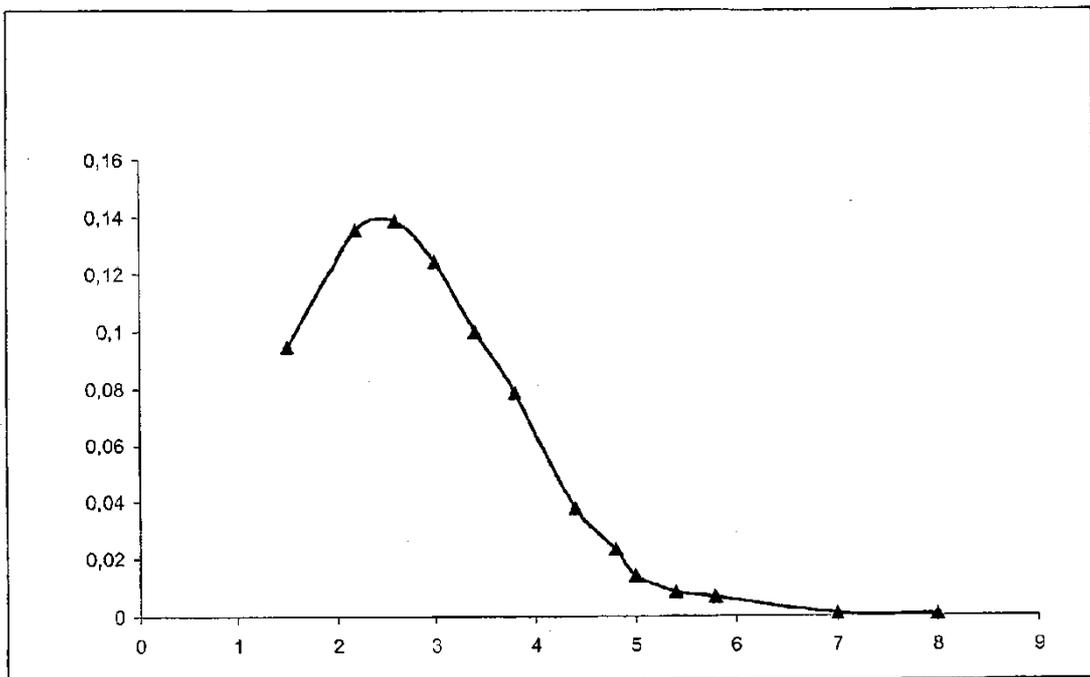


Fig. 2

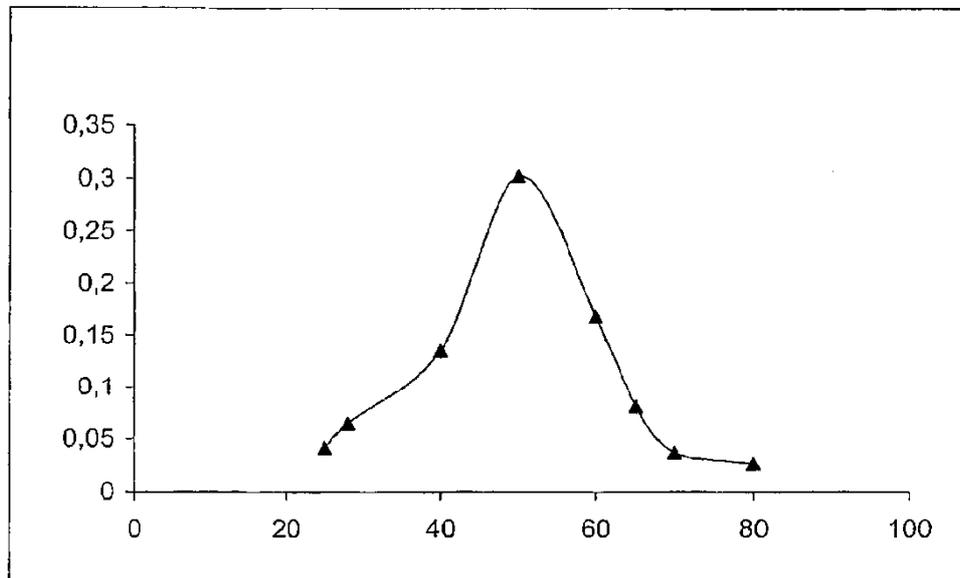


Fig. 3

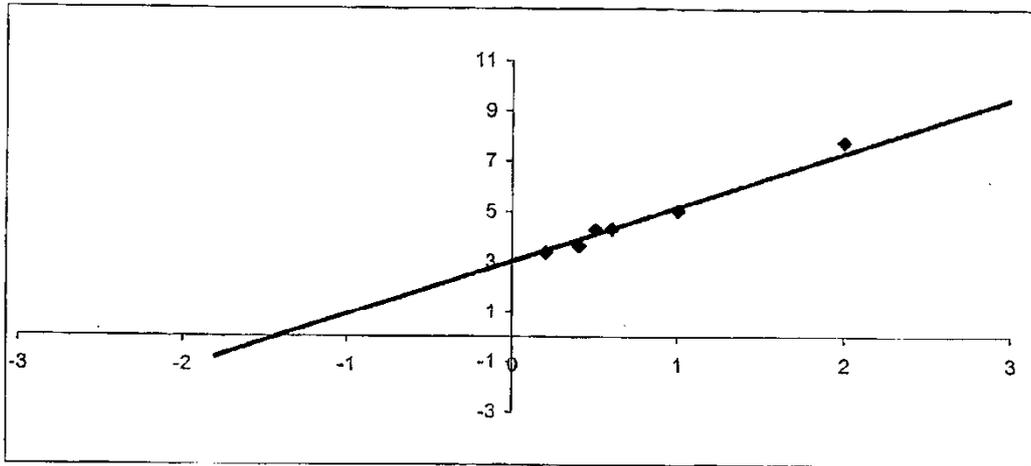


Fig. 4

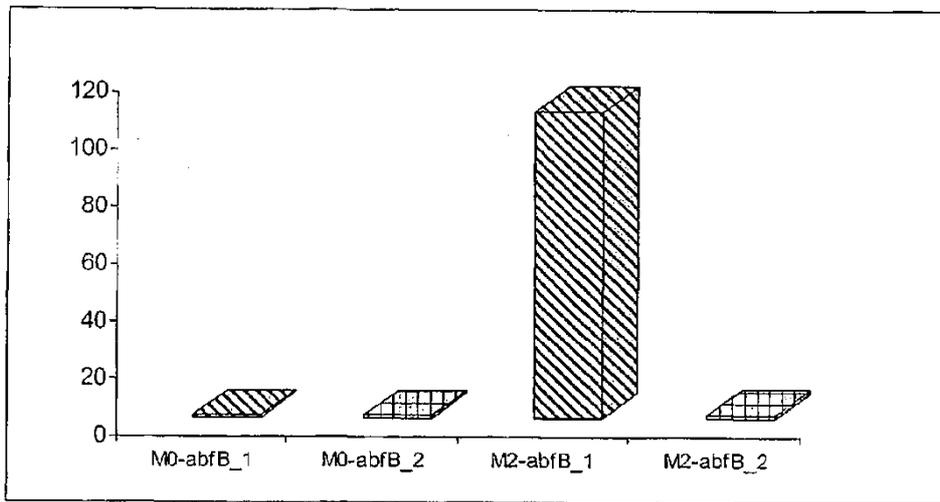


Fig. 5

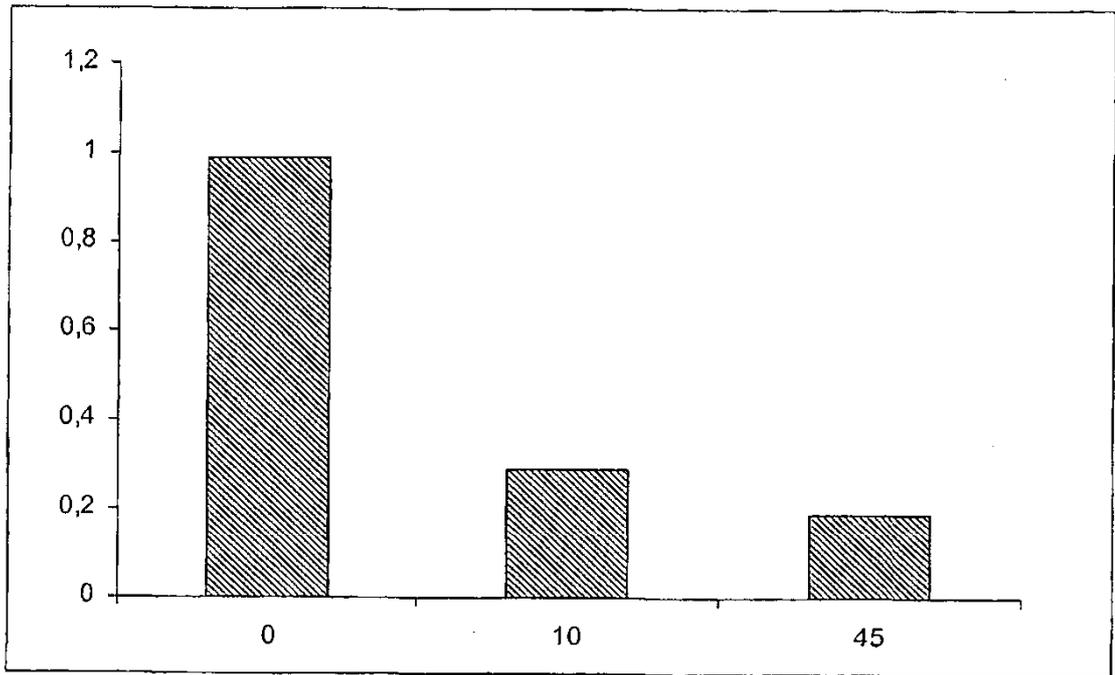


Fig. 6