

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 115**

51 Int. Cl.:

**A23K 10/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2014 PCT/EP2014/066080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15011277**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2014 E 14746992 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 3030094**

54 Título: **Polipéptidos que tienen actividad de alfa-xilosidasa y polinucleótidos que los codifican**

30 Prioridad:

**26.07.2013 EP 13178255**

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

**17.01.2018**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)  
Krogshoejvej 36  
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**KROGH, KRISTIAN, BERTEL, RØMER, M.;  
EKLÖF, JENS;  
JOHANSEN, KATJA, SALOMON;  
ROGOWSKI, ARTUR;  
BOLAM, DAVID, N. y  
GILBERT, HARRY, J.**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 650 115 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

Polipéptidos que tienen actividad de alfa-xilosidasa y polinucleótidos que los codifican

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador.

Referencia a un depósito de material biológico

10

[0002] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito público de material biológico, (ATCC 8483).

Antecedentes de la invención

15 Campo de la invención

[0003] La presente invención se refiere al uso de polipéptidos que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa y que pertenecen a la familia de las glucósido hidrolasas 31 (GH31, [www.cazy.org](http://www.cazy.org) y PMID:18838391) Cantarel et al.), especialmente la  $\alpha$ -xilosidasa GH31 designada como BACOVA 03422.

20

[0004] Nucleic Acids Res. 2009 Jan; 37 (Publicación en base de datos): D233-8. doi: 10.1093 / nar / gkn663. Epub 2008 Oct 5.

[0005] La base de datos Carbohydrate-Active EnZymes (CAZy): un recurso experto para la glucogenómica.

25

[0006] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B., y polinucleótidos que codifican los polipéptidos y los dominios catalíticos. La invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos así como a métodos de producción y uso de los polipéptidos y dominios catalíticos.

30

Descripción de la técnica relacionada

[0007] Las  $\alpha$ -xilosidasas cuya secuencia se conoce pertenecen a la familia GH31. Hasta la fecha, se han caracterizado tres  $\alpha$ -xilosidasas GH31 bacterianas (CjXyl31A, Larsbrink et al. 2011, Biochem. J. 436: 567-580; Yicl, Okuyama et al. 2004, Protein Expr. Purif. 37: 170-179; XylQ, Chaillou y col. 1998, J. Bacteriol. 180: 2312-2320) En arqueas, se ha descrito una  $\alpha$ -xilosidasa (XylS, Moracci et al. 2000, J. Biol. Chem. 275: 22082-22089) También se han descrito dos  $\alpha$ -xilosidasas GH31 fúngicas, *Aspergillus niger* (AxIA, Scott-Craig y col. 2011, J. Biol. Chem. 286: 42848-42854) y una  $\alpha$ -xilosidasa de *Aspergillus nidulans* (Bauer et al. 2006, Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 130: 11417-11422). Se ha demostrado que la AxIA de *A. niger* aumenta el rendimiento de azúcares fermentables en algunos sustratos cuando se complementa con preparaciones comerciales de celulasa. Se supuso que el mecanismo de acción ayudaba a la hidrólisis del xiloglucano (Jabbour et al. 2013, Biotechnol. Biocombustibles 6: versión en línea).

35

40

[0008] En plantas, se han descrito varias  $\alpha$ -xilosidasas GH31 (AXyl1 y Brassica GH31, Sampedro et al. 2001, Plant Physiol. 126: 910-920 y Iglesias et al. 2006, Plant Cell Physiol. 47: 55-63; de *Tropaeolum majus*, Crombie et al. 2002, Planta 214: 406-413; de *Oryza sativa*, Nakai et al. 2007, J. Biochem 142: 491-500) Además de estas, se han encontrado otras cuatro  $\alpha$ -xilosidasas en diversas especies, pero sus secuencias de aminoácidos o nucleótidos nunca se han determinado:  $\alpha$ -xilosidasa de *Aspergillus flavus* MO-5 (Yoshikawa et al. 1993, Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 1281-1285; Yoshikawa et al. 1993, Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 121-125);  $\alpha$ -xilosidasa de *Pisum sativum* (O'Neill et al. 1989, J. Biol. Chem. 264: 20430-20437);  $\alpha$ -xilosidasa de *Bacillus* (Zong et al. 1989, Agric. Biol. Chem. 53: 2129-2139); *Aspergillus niger* (Yoshikawa et al. 1994, Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1392-1398) Todas estas son menos de un 50% idénticas a la proteína madura de la SEQ ID NO: 2 de este documento.

45

50

[0009] Se han publicado varias secuencias en la base de datos UNIPROT (referencia) que están indicadas como Glicosil hidrolasas que pertenecen a la familia 31 (EC = 3.2.1.-;) o simplemente como "proteína". Esto también incluye las SEQ ID NO: 2 y 3 como se ejemplifica aquí. Las identidades de secuencia de estas secuencias respecto a la SEQ ID NO: 2 varían del 100% al 97,8%. Otras secuencias relacionadas (por identidad de secuencia) están por debajo del 77,2% de identidad.

55

60

[0010] De este modo, la SEQ ID NO: 2 está publicada como UNIPROT: A7LZZ5 con la referencia Fulton, L Clifton, S Fulton, B Xu, J Minx, P Pepin, KH Johnson, M Thiruvilangam, P Bhonagiri, V Nash, WE Mardis, ER Wilson, RK. Introducida (MAR-2007) en las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ, y Sudarsanam, P Ley, R Guruge, J Turnbaugh, PJ Mahowald, M Liep, D Gordon, J. Borrador de secuencia de genoma de *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483). Introducida (APR-2007) en las bases de datos EMBL/GenBank/DDBJ.

65

[0011] También se describen secuencias que tienen entre un 99,2 y un 97,8 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 como UNIPROT: I9STF6 (Bacteroides CL02T12CO4), UNIPROT: D7J3T4 (Bacteroides sp. D22), UNIPROT: I9ADV6 (Bacteroides xylanisolvens CL03T12C04), UNIPROT: D4VSZ2 (Bacteroides ovatus SD CC 2a), UNIPROT: C3QER3 (Bacteroides sp 2\_1\_22), UNIPROT: D4WF36 (Bacteroides xylanisolvens SD CC 1b) y algunas más

[0012] La presente invención proporciona el uso en pienso para animales de polipéptidos que tienen actividad  $\alpha$ -xilosidasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. En comparación con otras  $\alpha$ -xilosidasas GH31 que actúan sobre paranitrofenol  $\alpha$ -D-xilosa o sobre el motivo X (Fry et al. 1993, *Physiol. Planta.* 89: 1-3) en el extremo no reductor de xiloglucopolisacáridos. La  $\alpha$ -xilosidasa de la SEQ ID NO: 2 ( $\alpha$ -xilosidasa GH31 designada como BACOVA 03422) es específica del xilano de maíz y tiene una actividad específica más alta en xilano de maíz en comparación con CjXyl31.

#### Resumen de la invención

[0013] La presente invención se refiere al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa seleccionados del grupo que consiste en:

- (a) un polipéptido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta, o muy alta con (i) la secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, o (ii) el complemento de longitud completa de (i);
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 97,8% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1
- (e) un fragmento del polipéptido de (a), (b) o (c) que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa. También se describen polipéptidos aislados que comprenden un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un dominio catalítico que tiene al menos un 97,8% de identidad de secuencia con los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 2
- (b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de astringencia alta o muy alta con (i) los nucleótidos 64 a 2442 de la SEQ ID NO: 1, o (ii) el complemento de longitud completa de (i);
- (c) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido que tiene al menos un 97,8% de identidad de secuencia con los nucleótidos 64 a 2442 de la SEQ ID NO: 1
- (e) un fragmento del dominio catalítico de (a), (b), (c) que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa.

[0014] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención; construcciones de ácidos nucleicos; vectores de expresión recombinantes; células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos; y métodos para producir los polipéptidos.

[0015] La presente invención también se refiere a polipéptidos variantes que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa y que tienen al menos 80%, por ejemplo al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 que comprende al menos una sustitución, delección y/o inserción de al menos uno o más (varios) aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

[0016] La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden un polipéptido aislado que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa, seleccionado del grupo que consiste en:

- (a) un polipéptido que tiene al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con:

- (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; y/o
- (ii) la cadena complementaria de longitud completa de (i);

- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91 %, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1;
- (d) una variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos

de la SEQ ID NO: 3; y

(e) un fragmento de un polipéptido de (a), (b), (c) o (d), que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa.

[0017] Las composiciones pueden ser composiciones de pienso para animales. La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención, construcciones de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos, y a métodos de producción recombinante de los polipéptidos. La presente invención también se refiere a métodos para preparar una composición para uso en pienso para animales, a métodos para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, y a métodos para tratar proteínas para usar en composiciones para piensos para animales. También se describe un polinucleótido que codifica un péptido señal que comprende o que consiste en los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID NO: 2, que está operativamente unido a un gen que codifica una proteína; construcciones de ácidos nucleicos, vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos; y métodos para producir una proteína.

[0018] La invención también proporciona composiciones de pienso para animales que comprenden los polipéptidos usados. La presente invención también se refiere a métodos para preparar una composición para uso en pienso para animales, para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, y a métodos para tratar ingredientes vegetales para usar en composiciones de pienso para animales.

Breve descripción de las figuras

[0019]

La Figura 1 muestra un alineamiento parcial de una sección de Yicl y la SEQ ID NO: 2, donde BoXyl31A (la  $\alpha$ -xilosidasa de la SEQ ID NO: 2) muestra los residuos del sitio activo en letra negrita. Las posiciones de los residuos del sitio activo también están marcadas con un asterisco encima de la alineación. Asp 400 (n° 36 en la figura) y el ácido/base Asp 473 (n° 102 en la figura) de la SEQ ID N °: 2 son el nucleófilo y el ácido/base, respectivamente.

La Figura 2 muestra la cromatografía en capa fina que muestra la actividad de GH31 de *B. ovatus* contra xilanos decorados. Líneas D-H: xilanos solos. Líneas I-M: xilanos + GH31. Arabinoxilano de centeno (líneas D y H), glucuronoxilano de madera de abedul (líneas E e I), xilano de avena (carriles F y J), arabinoxilano de trigo (carriles G y K). Xilano de salvado de maíz (líneas H y L). La línea A es una mezcla X1 a X6 de patrones de D-xilo-oligosacáridos (Megazyme). Las líneas B y C son patrones de L-arabinosa y L-galactosa, respectivamente (Sigma).

monosacáridos liberados por diferentes tratamientos enzimáticos. Los monosacáridos se indican en las figuras de la siguiente manera: arabinosa, galactosa, fucosa, glucosa, xilosa.

La Figura 3 muestra trazos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que muestran que GH31 (BACOVA\_03422) libera xilosa de xilano de maíz (Ejemplo 2).

La Figura 4 muestra un trazado de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que muestra el producto GH31 (BACOVA\_03422) enriquecido con estándar de D-xilosa para confirmar la identidad (Ejemplo 2).

La Figura 5 compara las actividades de GH31 (BACOVA\_03422) y GH31 de *C. japonicus* (ACE86259) GH31 de *Bo* y GH31 de *C. japonicus* que actúa sobre los oligosacáridos de xiloglucano. Se observa que GH31 (BACOVA\_03422) es mucho menos activa frente al heptasacárido de xiloglucano (XXXG) que *Cj* GH31 (> 50,000x). Sin embargo, GH31 de *B.ovatus* es >100 veces más activa en xilano de maíz que  $\alpha$ -xilosidasa GH31 de *C.japonicus* (Ejemplo 2).

La Figura 6 también muestra la diferencia entre los índices relativos de GH31 (BACOVA\_03422) y GH31 de *C. japonicus* (ACE86259) frente a xilano de salvado de maíz y a heptasacárido de xiloglucano (XXXG). La  $\alpha$ -xilosidasa GH31 de *B. ovatus* es aproximadamente 100 veces más activa en xilano de maíz que la  $\alpha$ -xilosidasa GH31 de *C. japonicus* (panel A). Índices relativos de las dos enzimas en el heptasacárido de xiloglucano XXXG (panel B). La  $\alpha$ -xilosidasa GH31 de *B. ovatus* es aproximadamente 10000 veces menos activa en el sustrato de oligosacárido XXXG que la  $\alpha$ -xilosidasa GH31 de *C. japonicus* (Ejemplo 2).

La Figura 7 muestra (GH31): Monosacáridos liberados de goma de fibra de maíz después de tres tratamientos enzimáticos diferentes utilizando la  $\alpha$ -xilosidasa GH31, UltraFlo L y una combinación. GH31 tiene un efecto sinérgico en la liberación de xilosa de la goma de fibra de maíz cuando se usa junto con UltraFlo L (Ejemplos 3 y 4).

La Figura 8 muestra el efecto de  $\alpha$ -xilosidasa GH31 en monosacáridos liberados de salvado de maíz desestabilizado. Los niveles de azúcar se expresan como el área bajo la curva multiplicada por un factor de dilución. La figura también muestra los efectos de  $\alpha$ -L-galactosidasa GH95 y otras enzimas (GH11, GH43 / 51 y combinaciones (Ejemplos 3 y 4).

Breve descripción del listado de secuencias

[0020] En el listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia ADN de la  $\alpha$ -xilosidasa aislada de *Bacteroides ovatus* ATCC 8483.

SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos sacada de la SEQ ID NO: 1 (UNIPROT: A7LZZ5).

SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de  $\alpha$ -xilosidasa de *Bacteroides ovatus*.

SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de *Bacteroides* CL.

SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos del péptido maduro de *Bacteroides* sp. D22.

5

Matriz de identidad de secuencias:

SEQ ID NO:	2	3	4	5
2	100	99,2	98,8	99,3
3	99,2	100	98,2	99,0
4	98,8	98,2	100	98,6
5	99,3	99,0	98,6	100

#### Definiciones

10

[0021]  $\alpha$ -xilosidasa: el término " $\alpha$ -xilosidasa" significa una enzima que muestra actividad de  $\alpha$ -xilosidasa (EC 3.2.1.177) que cataliza la hidrólisis de una unidad  $\alpha$ -xilosil en xilano. Para los fines de la presente invención, la actividad de  $\alpha$ -xilosidasa se determina de acuerdo con el procedimiento descrito en los ejemplos. En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de  $\alpha$ -xilosidasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

15

20

[0022] Variante alélica: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce de manera natural a través de la mutación, y puede dar lugar a un polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

25

[0023] Dominio catalítico: el término "dominio catalítico" significa la región de una enzima que contiene la maquinaria catalítica de la enzima.

30

[0024] ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro y empalmado obtenida de una célula eucariota o procariota. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito inicial primario de ARN es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, que incluyen el corte y empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

35

[0025] Secuencia codificante: El término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante generalmente están determinados por un marco de lectura abierto, que comienza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de los mismos.

40

[0026] Secuencias de control: El término "secuencias de control" significa secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o foránea (es decir, de un gen diferente) respecto del polinucleótido que codifica el polipéptido o nativas o foráneas entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptidos, promotor, secuencia de péptidos señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de terminación transcripcional y traslacional. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica un polipéptido.

45

50

[0027] Expresión: El término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

55

[0028] Vector de expresión: El término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está operativamente enlazada a secuencias de control que permiten su expresión.

[0029] Fragmento: El término "fragmento" significa un polipéptido o un dominio catalítico que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del extremo amino terminal y/o carboxi terminal de un polipéptido o dominio maduro; donde el fragmento tiene actividad de  $\alpha$ -xilidasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de los aminoácidos del péptido maduro.

[0030] Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible a una transformación, transfección, transducción o similar con una construcción de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0031] Aislado: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o entorno que no ocurre en la naturaleza.

Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no ocurra de forma natural, (2) cualquier sustancia incluyendo, pero sin limitarse a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se elimina al menos parcialmente de uno o más o todos los componentes de origen natural con el cual/con los cuales está asociado en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre en relación con esa sustancia que se encuentra en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada al aumentar la cantidad de la sustancia en relación con otros componentes con los que está naturalmente asociada (por ejemplo, producción recombinante en una célula huésped; copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; y uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia).

[0032] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento en el N-terminal, truncamiento en el C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 1 a 793 (número 22 a 814 si se cuenta con el péptido señal) de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 3 basado en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que indica que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID NO: 2 son un péptido señal. Se sabe en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos de más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido diferente en el C-terminal y/o N-terminal) expresados por el mismo polinucleótido. También se sabe en la técnica que células huésped diferentes procesan los polipéptidos de manera diferente y, por lo tanto, una célula huésped que expresa un polinucleótido puede producir un polipéptido maduro diferente (por ejemplo, con un aminoácido diferente en el extremo C-terminal y/o N-terminal) en comparación con otra célula huésped que expresa el mismo polinucleótido. En un aspecto, un polipéptido maduro contiene hasta 105%, 110% o 115% del número de aminoácidos del polipéptido maduro.

[0033] Secuencia codificante de polipéptido maduro: el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de  $\alpha$ -xilidasa. En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 2442 de la SEQ ID NO:1 basándose en SignalP (Nielsen et al., 1997, supra), que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID NO: 1 codifican un péptido señal.

[0034] Construcción de ácidos nucleicos: el término "construcción de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, de una sola cadena o de doble cadena, que se aísla de un gen de origen natural o se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existiría en la naturaleza de otro modo o que es sintético, que comprende una o más secuencias de control.

[0035] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada respecto a la secuencia de codificación de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0036] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad de secuencia".

[0037] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453) según está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16:276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de hueco de 10, penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100) / (Longitud de alineamiento - Número total de huecos en alineamiento)

[0038] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) según está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: LThe European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros utilizados son la penalización por apertura de hueco de 10, la penalización de extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EADNFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "identidad más larga" (obtenido mediante la opción -nobrief) se utiliza como identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

10 (Desoxirribonucleótidos idénticos x 100) / (Lognitud de alineamento - Número total de huecos en alineamiento)

[0039] Condiciones de astringencia: las distintas condiciones de astringencia se definen como sigue.

15 [0040] El término "condiciones de astringencia muy baja" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 45 ° C.

20 [0041] El término "condiciones de astringencia baja" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 50°C.

30 [0042] El término "condiciones de astringencia media" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 35%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 55°C.

35 [0043] El término "condiciones de astringencia media-alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 35%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 60°C.

40 [0044] El término "condiciones de astringencia alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 65 ° C.

45 [0045] El término "condiciones de astringencia muy alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón esquilado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 70 °C.

50 [0046] Subsecuencia: El término "subsecuencia" significa un polinucleótido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5 'y/o 3' terminal de una secuencia codificante de un polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 85%, 90% o 95% de los nucleótidos que codifican el polipéptido maduro de la SEQ ID NO:2

60 [0047] Variante: El término "variante" significa un polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa que comprende una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa la sustitución del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos, por ejemplo, 1-5 aminoácidos, adyacentes al aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos, por ejemplo, 1-5 aminoácidos, adyacentes al aminoácido que ocupa una posición.

65 Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa

- 5 [0048] En Una forma de realización, la presente invención se refiere al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 80%, al menos 82%, al menos 84%, al menos 85 %, al menos 87%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98 %, al menos 99% o 100%, que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en hasta 30, 25, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 10 [0049] La presente invención también se refiere al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4 de al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%. , al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97% , al menos 98%, al menos 99% o 100%, que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de treinta y seis aminoácidos, por ejemplo, en treinta aminoácidos, en veinticinco aminoácidos, en veinte aminoácidos, en quince aminoácidos, en diez aminoácidos, en nueve aminoácidos, en ocho aminoácidos, en siete aminoácidos, en seis aminoácidos, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4 .
- 15 [0050] La presente invención se refiere además al uso en pienso para animales de polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 5 de al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87% , al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97% , al menos 98%, al menos 99% o 100%, que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa. En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de treinta y seis aminoácidos, por ejemplo, en treinta aminoácidos, en veinticinco aminoácidos, en veinte aminoácidos, en quince aminoácidos, en diez aminoácidos, en nueve aminoácidos , en ocho aminoácidos, en siete aminoácidos, en seis aminoácidos, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos, y en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 5.
- 20 [0051] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos 80% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 25 [0052] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 82% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 30 [0053] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos 84% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 35 [0054] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 40 [0055] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 86% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 45 [0056] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 87% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 50 [0057] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos 88% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 55 [0058] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 89% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 60 [0059] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 65



- [0060] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en pienso para animales o detergentes que tienen al menos un 91% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 5 [0061] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 10 [0062] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 15 [0063] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 20 [0064] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 25 [0065] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 30 [0066] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 35 [0067] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 40 [0068] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 45 [0069] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene una identidad de secuencia del 100% con el polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 2.
- 50 [0070] Cada una de las formas de realización anteriores también se refiere no solo a la SEQ ID NO: 2, sino también a cualquiera de las SEQ ID NO: 4 y 5. Por lo tanto, la invención también se refiere a lo que sigue.
- 55 [0071] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 60 [0072] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 82% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 65 [0073] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- [0074] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- [0075] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 86% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- [0076] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 87% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.

- 5 [0077] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos 88% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- [0078] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos 89% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 10 [0079] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 15 [0080] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para usar en pienso para animales o detergentes que tienen al menos un 91% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- [0081] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 20 [0082] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 25 [0083] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 30 [0084] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 35 [0085] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- [0086] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 40 [0087] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos 98% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 45 [0088] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 50 [0089] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene una identidad de secuencia del 100% con el polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 4.
- 55 [0090] Y
- [0091] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 60 [0092] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 82% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 65 [0093] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 84% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.

- 5 [0094] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- [0095] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 86% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 10 [0096] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 87% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 15 [0097] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 88% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 20 [0098] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 89% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 25 [0099] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- [0100] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido para uso en pienso para animales o detergentes que tienen al menos un 91% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 30 [0101] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 35 [0102] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 40 [0103] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 45 [0104] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- [0105] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 50 [0106] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 55 [0107] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 60 [0108] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia respecto al polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- 65 [0109] Una forma de realización de la invención usa un polipéptido o un polipéptido codificado por un polinucleótido en pienso para animales que tiene una identidad de secuencia del 100% con el polipéptido (maduro) de la SEQ ID NO: 5.
- [0110] Un polipéptido para usar en la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia

de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma al que le faltan, por ejemplo, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 aminoácidos del extremo N- y/o C-terminal y que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 4, y/o los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 5.

[0111] En otra forma de realización, la presente invención se refiere al uso en pienso para animales de un polipéptido aislado que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, o (ii) el complemento de longitud completa de (i) (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York).

[0112] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de esta, así como el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de esta, pueden usarse para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa procedentes de cepas de diferentes géneros o especies según métodos ampliamente conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos Southern Blot estándar, con el fin de identificar y aislar ahí el gen correspondiente. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben ser de al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico tiene al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas de ADN y ARN. Las sondas suelen estar marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ , biotina o avidina). Dichas sondas están abarcadas por la presente invención.

[0113] Una genoteca de ADN genómico o de ADNc preparada a partir de tales otras cepas puede rastrearse para detectar ADN que se hibride con las sondas descritas anteriormente y codifique un polipéptido que tiene actividad de alfa-xilosidasa. El ADN genómico o de otro tipo de tales otras cepas se puede separar mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida u otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado puede transferirse a nitrocelulosa u otro material portador adecuado e inmovilizarse en él. Con el fin de identificar un clon o ADN que se hibrida con la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de la misma, el material de soporte se usa en un Southern blot.

[0114] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a (i) SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; (iii) el complemento completo de esta; o (iv) una subsecuencia de esta; en condiciones de astringencia muy baja a muy alta. Las moléculas a las que se hibrida la sonda de ácido nucleico en estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

[0115] En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 2; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico es la región codificante del polipéptido maduro contenida en *B. Ovatum* ATCC - 8483.

[0116] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia alta a muy alta se definen como prehibridación e hibridación a 42 ° C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 25% para astringencias muy bajas y bajas, formamida al 35% para astringencias medias y medias-altas, o formamida al 50% para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas de manera óptima. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 65 ° C (astringencia alta), y a 70 ° C (astringencia muy alta).

[0117] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación e hibridación a aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la  $T_m$  calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl, pH 7.6, 6 mM EDTA, NP-40 al 0,5%, solución de Denhardt 1x, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos Southern Blot estándar durante 12 a 24 horas de forma óptima. El material portador se lava finalmente una vez en SCC 6X más SDS al 0,1% durante 15 minutos y dos veces, cada una durante 15 minutos, usando SSC6X a entre 5 ° C y 10 ° C por debajo de la  $T_m$  calculada.

[0118] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado para usar en pienso

para animales que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 de al menos 97,8%, al menos 98%, al menos 99% o 100%.

5 [0119] En otra forma de realización, la presente invención se refiere a variantes para uso en pienso para animales del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 que comprende una sustitución, delección y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En una forma de realización, el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 es de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Los cambios en los aminoácidos pueden ser de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegamiento y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones en los extremos amino o carboxilo terminales, tales como un residuo de metionina en el extremo amino terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0120] Ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, New York. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

25 [0121] Alternativamente, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se ven alteradas. Por ejemplo, los cambios en los aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

30 [0122] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de barrido con alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085) En esta última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se analizan para determinar la actividad de  $\alpha$ -xilosidasa para identificar residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también puede determinarse por análisis físico de la estructura, según se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al, 1992, *J. Mol. Biol.* 224:899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309:59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también puede inferirse a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado. Los residuos catalíticos de la SEQ ID NO:2 son el nucleófilo Asp400 (n° 36 en la Fig. 1) y el ácido/base Asp 473 (n°102 en la Fig.1) basándose en la homología con otras hidrolasas Gh31 (véase el alineamiento de la fig.1).

45 [0123] Se pueden realizar y probar sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o mezcla, seguido de un procedimiento de selección relevante, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen la PCR propensa a errores, el *phage display* (p. Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; U.S. Patent No. 5,223,409; WO 92/06204), y la mutagénesis dirigida (Derbyshire et al, 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

55 [0124] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896) Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

60 [0125] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido está fusionado en el extremo N terminal o en el extremo C terminal de una región de otro polipéptido.

65 [0126] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido está fusionado en el extremo N terminal o en el extremo C terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la

técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos para que estén dentro del marco y para que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del mismo promotor o promotores y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína en la que los polipéptidos de fusión se crean post-traduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

[0127] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero no se limitan a, los sitios descritos en Martin et al, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3:568-576; Svetina et al, 2000, J. Biotechnol. 76:245-251; Rasmussen-Wilson et al, 1997, Appl. Reinar. Microbiol. 63:3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

15 Fuentes de polipéptidos que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa

[0128] Un polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de" como se usa en el presente documento en conexión con una fuente dada significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el polipéptido obtenido de una fuente dada se secreta extracelularmente.

[0129] El polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano Gram-negativo tal como un polipéptido de *Bacteroides*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, o *Ureaplasma* o un polipéptido bacteriano Gram-positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, o *Streptomyces* que tiene actividad de alfa xilosidasa.

[0130] En un aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides acidifaciens*, *Bacteroides gracilis*, *Bacteroides oris*, *Bacteroides putredinis*, *Bacteroides pyogenes* o *Bacteroides vulgatus*.

[0131] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Bacteroides ovatus*, por ejemplo, un polipéptido obtenido de *Bacteroides ovatus* ATCC 8483.

[0132] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*.

[0133] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, o *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[0134] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, o *Streptomyces lividans*.

[0135] El polipéptido puede ser un polipéptido fúngico. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*; o un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvvariella*, o *Xylaria*.

[0136] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

[0137] En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium*

*crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia setosa*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0138] Se entenderá que, para las especies mencionadas anteriormente, la invención abarca tanto el estado perfecto como el imperfecto, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que se conocen. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes adecuados.

[0139] Las cepas de estas especies son de fácil acceso para el público en una serie de colecciones de cultivos, como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y el Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0140] El polipéptido puede identificarse y obtenerse a partir de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo tierra, compost, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo tierra, compost, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales son ampliamente conocidas en la técnica. Se puede obtener un polinucleótido que codifica el polipéptido rastreando de forma similar una genoteca de ADN genómico o de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mixto. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un polipéptido con la(s) sonda(s), el polinucleótido puede aislarse o clonarse utilizando técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica. (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Dominios catalíticos

[0141] En una forma de realización, la presente invención también se refiere a dominios catalíticos que tienen una identidad de secuencia respecto a los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 2 de al menos el 97,8%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 87%, al menos el 88%, al menos el 89%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, al menos el 92%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o 100%. En un aspecto, los dominios catalíticos comprenden secuencias de aminoácidos que difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, de los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 2.

[0142] El dominio catalítico comprende o consiste preferiblemente en los aminoácidos 1 a 793 de la SEQ ID NO: 2 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de alfa-xilosidasa.

[0143] En otra forma de realización, la presente invención también se refiere a dominios catalíticos codificados por polinucleótidos que se hibridan en condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia media-alta, condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta (como se ha definido anteriormente) con (i) los nucleótidos 64 a 2442 de la SEQ ID NO: 1, o (iii) el complemento de longitud completa de (i) (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[0144] En otra forma de realización, la presente invención también se refiere a dominios catalíticos codificados por polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia respecto a los nucleótidos 64 a 2442 de la SEQ ID NO: 1 de al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 86%, al menos el 87%, al menos el 88%, al menos el 89%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99%, al menos el 92%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, al menos el 99% o 100%.

[0145] El polinucleótido que codifica el dominio catalítico comprende preferiblemente o está constituido por los nucleótidos 64 a 2442 de la SEQ ID NO: 1 o es la secuencia contenida en ATCC 8483.

[0146] En otra forma de realización, la presente invención también se refiere a variantes de dominio catalítico de los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 2 que comprenden una sustitución, delección y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En un aspecto, el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en la secuencia de los aminoácidos 22 a 814 de la SEQ ID NO: 2 es de hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 o 10.

## Polinucleótidos

[0147] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido, un dominio catalítico de la presente invención como se describe en este documento.

[0148] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico o ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos del ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, utilizando la ampliamente conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el cribado de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada por ligación (LAT) y la amplificación basada en polinucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos pueden clonarse a partir de una cepa de *Bacteroides*, o un organismo relacionado y, por lo tanto, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región que codifica el polipéptido del polinucleótido.

[0149] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas no naturales del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera modificada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. Las variantes se pueden construir sobre la base del polinucleótido presentado como la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1.

## Construcciones de ácidos nucleicos

[0150] La invención también se refiere a construcciones de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0151] El polinucleótido puede manipularse de diversas maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son ampliamente conocidas en la técnica.

[0152] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control de la transcripción que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y puede obtenerse a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0153] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, gen de penicilinas (*PenP*) de *Bacillus licheniformis*, gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, gen de levansacarasa (*SacB*) de *Bacillus subtilis*, los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaïsse and Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), el operón *lac* de *E. coli*, el promotor *trc* de *E. coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), el gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, y gen de beta-lactamasa procarionta (Villa-Kamaroff et al, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer et al, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25) Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, *supra*. Algunos ejemplos de promotores en tándem se describen en WO 99/43835.

[0154] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos a partir de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable a los ácidos de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y factor de elongación de la traducción



de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado de un gen neutro de alfa-amilasa de *Aspergillus* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados de un gen neutro de alfa-amilasa de *Aspergillus niger* en el que el líder no traducido ha sido reemplazado por un líder no traducido de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos. Otros promotores se describen en la patente de EE. UU. No. 6,011,147.

[0155] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactosidasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para las células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *Yeast* 8: 423-488.

[0156] La secuencia de control también puede ser un terminador de la transcripción, que es reconocido por una célula huésped para terminar la transcripción. El terminador está unido operativamente al extremo 3' terminal del polinucleótido que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped puede usarse en la presente invención.

[0157] Los terminadores preferidos para las células huésped bacterianas se obtienen de los genes para proteasa alcalina (*aprH*) de *Bacillus clausii*, alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, y ARN ribosómico (*rnmB*) de *Escherichia coli*.

[0158] Los terminadores preferidos para células huésped de hongos filamentosos se obtienen de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa III de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, y factor de elongación de la traducción de *Trichoderma reesei*.

[0159] Los terminadores preferidos para las células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0160] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm en dirección 5' respecto de un promotor y en dirección 3' de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0161] Se obtienen ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas a partir de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue *et al.*, 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).

[0162] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por parte de la célula huésped. El líder está unido operativamente al extremo 5' terminal del polinucleótido que codifica el polipéptido. Se puede usar cualquier líder que sea funcional en la célula anfitriona.

[0163] Los líderes preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0164] Los líderes adecuados para las células huésped de levadura se obtienen de los genes de enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0165] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' terminal del polinucleótido y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.

[0166] Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0167] En Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15:5983-5990 se describen secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura.

[0168] La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica un péptido señal unido al extremo N terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido hasta la vía secretora de la célula. El extremo 5' terminal de la secuencia de codificación del polinucleótido puede contener inherentemente una secuencia de codificación de péptido señal unida naturalmente en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia de codificación que codifica el polipéptido. Alternativamente, el extremo 5' terminal de la secuencia de codificación puede contener una secuencia de codificación de péptido señal que es foránea a la secuencia de codificación. Puede requerirse una secuencia codificante de péptido señal foránea cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una secuencia codificante de péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante de péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para potenciar la secreción del polipéptido. Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirija el polipéptido expresado hasta la vía secretora de una célula huésped.

[0169] Secuencias codificantes de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica NCIB 11837 de *Bacillus subtilis*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus*, y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0170] Secuencias codificantes de péptidos de señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutral de *Aspergillus niger*, nigerglucoamilasa de *Aspergillus*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0171] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptidos señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0172] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica un propéptido situado en el extremo N terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente es inactivo y puede convertirse en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido respecto del propolipéptido. La secuencia de codificación del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0173] Cuando están presentes tanto las secuencias de péptido señal como de propéptido, la secuencia de propéptido se coloca junto al extremo N terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal se posiciona junto al extremo N terminal de la secuencia del propéptido.

[0174] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que hacen que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Las secuencias reguladoras en los sistemas procarióticos incluyen sistemas de operón *lac*, *tac*, y *trp*. En levaduras, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se puede usar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, el promotor de celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, y el promotor de celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría operativamente unido a la secuencia reguladora.

#### Vectores de expresión

[0175] También se describen vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las diversas secuencias de nucleótidos y control se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en dichos sitios. Alternativamente, el polinucleótido puede expresarse insertando el polinucleótido o una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia de codificación se ubica en el vector de modo que la secuencia de codificación se une operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

- 5 [0176] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que se puede someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir el vector. El vector puede ser un plásmido circular lineal o cerrado.
- 10 [0177] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma (s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.
- 15 [0178] El vector preferiblemente contiene uno o más marcadores seleccionables que permiten la fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.
- 20 [0179] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis* o marcadores que confieren resistencia a antibióticos, tal como resistencia a ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomycinina o tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero no se limitan a, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, entre otros, *AdeA* (fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida sintasa), *adeB* (fosforribosilaminoimidazol sintasa), *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato de adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), así como sus equivalentes. Para usar en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*. Para usar en una célula de *Trichoderma* se prefieren los genes *adeA*, *adeB*, *amdS*, *hph*, y *pyrG*.
- 25 [0180] El marcador seleccionable puede ser un sistema de marcador seleccionable dual como se describe en WO 2010/039889. En un aspecto, el marcador seleccionable dual es un sistema de marcador dual seleccionable *hph-tk*.
- 30 [0181] El vector preferiblemente contiene un elemento o elementos que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.
- 35 [0182] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para su integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación o ubicaciones precisas en el cromosoma o cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10 000 pares de bases, de 400 a 10 000 pares de bases y de 800 a 10 000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia respecto a la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga con la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser polinucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.
- 40 [0183] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector se replique autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie en la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite la replicación de un plásmido o un vector *in vivo*.
- 45 [0184] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de la replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1 que permiten la replicación en *Bacillus*.
- 50 [0185] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.
- 55 [0186] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15:9163-9175; WO 00/24883) El aislamiento
- 60
- 65

del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden lograr según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0187] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido. Puede obtenerse un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido en el que las células contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto, se pueden seleccionar copias adicionales del polinucleótido cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0188] Los procedimientos usados para ligar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son ampliamente conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

#### 15 Células huésped

[0189] En este documento también se describen células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente unido a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Se introduce una construcción o vector que comprende un polinucleótido en una célula huésped de modo que la construcción o vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0190] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0191] La célula huésped procariota puede ser cualquier bacteria Gram-positiva o Gram-negativa. Las bacterias Gram-positivas incluyen, pero no están limitadas a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*. Las bacterias Gram-negativas incluyen, entre otras, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.

[0192] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus turingiensis*.

[0193] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*.

[0194] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluyendo, pero no sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

[0195] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Mol. Gen. Genet.* 168:111-115), transformación de células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, *J. Bacteriol.* 81:823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *J. Mol. Biol.* 56:209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, *Biotechniques* 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *J. Bacteriol.* 169:5271-5278) La introducción de ADN en una célula de *E coli* puede efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, *J. Mol. Biol.* 166:557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, *Nucleic Acids Res.* 16:6127-6145) La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede efectuarse por transformación de protoplastos, electroporación (ver, por ejemplo, Gong et al, 2004, *Folia Microbiol. (Praha)* 49: 399-405), conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier et al, 1989, *J. Bacteriol.* 171:3583-3585), o transducción (ver, por ejemplo, Burke y col., 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6289-6294) La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede efectuarse por electroporación (ver, por ejemplo, Choi y col., 2006, *J. Microbiol. Methods* 64: 391-397) o conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, *Appl. Environ. Microbiol.* 71:51-57) La introducción del ADN en una célula de *Sstreptococcus* puede efectuarse por la competencia natural (ver, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, *Infect. Immun.* 32:1295-1297), transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, *Microbios* 68: 189-207), electroporación (ver, por ejemplo, Buckley et al., 1999, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3800-3804), o conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, *Microbiol. Rdo.* 45:409-436) Sin embargo, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.

[0196] La célula huésped también puede ser eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta u hongo.

5 [0197] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se usa en este documento incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota, así como los Oomycota y todos los hongos mitospóricos (tal como se define en Hawksworth et al., In, Ainsworth y Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

10 [0198] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se usa en el presente documento incluye levadura ascospórica (Endomycetales), levadura basidiosporógena y levadura que pertenece a los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Dado que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención la levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore, y Davenport, editors, Soc. Aplicación Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

15 [0199] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

20 [0200] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según la definición de Hawksworth). *et al.*, 1995, *supra*) Los hongos filamentosos generalmente se caracterizan por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por crecimiento de la hifa y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* es por gemación de un tallo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

30 [0201] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

35 [0202] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

50 [0203] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Ciertos procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474 y Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156y WO 96/00787. La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, J. Bacteriol. 153:163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 75: 1920.

60 Métodos de producción

[0204] También se describen en es documento métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula, que en su forma silvestre produce el polipéptido, en condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y opcionalmente, (b) recuperar el polipéptido. En un aspecto, la célula es una célula de *Bacteroides*. En otro aspecto, la célula es una célula de *Bacteroides ovatus*. En otro aspecto, la

célula es *Bacteroides ovatus* ATCC 8483. Se divulgan métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula huésped recombinante de la presente invención en condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y opcionalmente, (b) recuperar el polipéptido.

5 [0205] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden cultivarse mediante cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (que incluye fermentaciones continuas, discontinuas, de lote alimentado o en estado sólido) en fermentadores industriales o de laboratorio en un medio adecuado y en condiciones que permitan expresar y/o aislar el polipéptido. El cultivo tiene lugar en un medio  
10 nutriente adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales o pueden prepararse según las composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta, se puede recuperar de lisados celulares.

15 [0206] El polipéptido se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección incluyen, entre otros, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático que usa paranitro-fenol- $\alpha$ -D-xilosa se puede usar para determinar la actividad del polipéptido.

20 [0207] El polipéptido puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. En un aspecto, se recupera un caldo de fermentación que comprende el polipéptido.

25 [0208] El polipéptido se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, por afinidad, de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos de electroforesis (por ejemplo, enfoque isoelectrónico preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, Janson y Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

30 [0209] En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera, sino que se usa una célula huésped de la presente invención que expresa el polipéptido como fuente del polipéptido.

35 Eliminación o reducción de la actividad de alfa xilosidasa

[0210] En este documento también se describen métodos para producir una mutante de una célula progenitora, que comprenden alterar o delecionar un polinucleótido, o una porción del mismo, que codifica un polipéptido de  
40 la presente invención, lo que da como resultado que la célula mutante produzca menos del polipéptido que la célula progenitora cuando se cultiva bajo las mismas condiciones.

[0211] La célula mutante puede construirse reduciendo o eliminando la expresión del polinucleótido usando métodos ampliamente conocidos en la técnica, por ejemplo, inserciones, interrupciones, reemplazos o  
45 delecciones. En un aspecto preferido, el polinucleótido es inactivado. El polinucleótido que se desea modificar o inactivar puede ser, por ejemplo, la región codificante o una parte de la misma esencial para la actividad, o un elemento regulador requerido para la expresión de la región codificante. Un ejemplo de dicha secuencia reguladora o de control puede ser una secuencia promotora o una parte funcional de la misma, es decir., una parte que es suficiente para afectar a la expresión del polinucleótido. Otras secuencias de control para una  
50 posible modificación incluyen, pero sin limitarse a, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, secuencia de péptido señal, terminador de la transcripción y activador de la transcripción.

[0212] La modificación o inactivación del polinucleótido se puede realizar sometiendo a la célula progenitora a mutagénesis y seleccionando células mutantes en las que se ha reducido o eliminado la expresión del  
55 polinucleótido. La mutagénesis, que puede ser específica o aleatoria, puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de un agente mutagenizante físico o químico adecuado, mediante el uso de un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis puede realizarse mediante el uso de cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes.

60 [0213] Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para el presente propósito incluyen radiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metilhidroxilamina, ácido nitroso, metanosulfonato de etilo (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico y análogos de nucleótidos.

[0214] Cuando se usan tales agentes, la mutagénesis se realiza típicamente incubando la célula progenitora que se desea mutagenizar en presencia del agente de mutagénesis de elección en condiciones adecuadas, y  
65 cribando y/o seleccionando células mutantes que muestren una expresión reducida o nula del gen.

[0215] La modificación o inactivación del polinucleótido puede realizarse por inserción, sustitución o delección de uno o más nucleótidos en el gen o un elemento regulador requerido para la transcripción o traducción del mismo. Por ejemplo, se puede insertar o eliminar nucleótidos para dar como resultado la introducción de un codón de terminación, la eliminación del codón de inicio o un cambio en el marco de lectura abierto. Dicha modificación o inactivación se puede llevar a cabo mediante mutagénesis dirigida o mutagénesis generada por PCR de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Aunque, en principio, la modificación se puede realizar *in vivo*, es decir, directamente sobre la célula que expresa el polinucleótido que se desea modificar, se prefiere que la modificación se realice *in vitro* como se ejemplifica a continuación.

[0216] Un ejemplo de una forma conveniente de eliminar o reducir la expresión de un polinucleótido se basa en técnicas de sustitución génica, eliminación génica o interrupción génica. Por ejemplo, en el método de interrupción génica, una secuencia de ácido nucleico correspondiente al polinucleótido endógeno se mutageniza *in vitro* para producir una secuencia de ácido nucleico defectuosa que luego se transforma en la célula progenitora para producir un gen defectuoso. Mediante recombinación homóloga, la secuencia defectuosa de ácido nucleico reemplaza al polinucleótido endógeno. Puede ser deseable que el polinucleótido defectuoso también codifique un marcador que pueda usarse para la selección de transformantes en los que el polinucleótido se ha modificado o destruido. En un aspecto, el polinucleótido se rompe con un marcador seleccionable tal como los descritos en este documento. También se describen métodos para inhibir la expresión de un polipéptido que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa en una célula, que comprende administrar a la célula o expresar en la célula una molécula de ARN de doble cadena (ARNdc), en la que el ARNdc comprende una subsecuencia de un polinucleótido de la presente invención. En un aspecto preferido, el ARNdc tiene aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos dúplex de longitud.

[0217] El ARNdc es preferiblemente un ARN interferente pequeño (ARNip) o un micro ARN (miARN). En un aspecto preferido, el ARNdc es un ARN interferente pequeño para inhibir la transcripción. En otro aspecto preferido, el ARNdc es micro ARN para inhibir la traducción. También se describen en ese documento tales moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc), que comprenden una porción de la secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 para inhibir la expresión del polipéptido en una célula. Si bien la presente invención no está limitada por ningún mecanismo particular de acción, el ARNdc puede entrar en una célula y causar la degradación de un ARN monocatenario (ARNmc) de secuencias similares o idénticas, que incluyen ARNm endógenos. Cuando una célula está expuesta a ARNdc, el ARNm del gen homólogo se degrada de forma selectiva mediante un proceso denominado interferencia por ARN (iARN).

[0218] Los ARNdc descritos en este documento pueden usarse en el silenciamiento génico. En un aspecto, la invención proporciona métodos para degradar selectivamente ARN usando una iARNdc de la presente invención. El proceso puede ser practicado *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En un aspecto, las moléculas de ARNdc se pueden usar para generar una mutación de pérdida de función en una célula, un órgano o un animal. Los métodos para fabricar y usar moléculas de ARNdc para degradar RNA selectivamente son ampliamente conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. nº 6,489,127; 6,506,559; 6,511,824; y 6,515,109.

[0219] La presente invención también se refiere a una célula mutante de una célula progenitora que comprende una interrupción o delección de un polinucleótido que codifica el polipéptido o una secuencia de control del mismo o un gen silenciado que codifica el polipéptido, que da como resultado que la célula mutante produzca menos polipéptidos o ningún polipéptido en comparación con la célula progenitora.

[0220] Las células mutantes deficientes en polipéptidos son particularmente útiles como células huésped para la expresión de polipéptidos nativos y heterólogos. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a métodos para producir un polipéptido nativo o heterólogo, que comprende (a) cultivar la célula mutante en condiciones que conducen a la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. El término "polipéptidos heterólogos" significa polipéptidos que no son nativos de la célula huésped, por ejemplo, una variante de una proteína nativa. La célula huésped puede comprender más de una copia de un polinucleótido que codifica el polipéptido nativo o heterólogo.

[0221] Los métodos usados para el cultivo y la purificación del producto de interés se pueden realizar mediante métodos conocidos en la técnica.

[0222] Los métodos aquí descritos para producir un producto esencialmente libre de  $\alpha$ -xilosidasa son de particular interés en la producción de polipéptidos eucariotas, en particular proteínas fúngicas tales como enzimas. Las células deficientes en  $\alpha$ -xilosidasa también pueden usarse para expresar proteínas heterólogas de interés farmacéutico tales como hormonas, factores de crecimiento, receptores y similares. El término "polipéptidos eucariotas" incluye no solo polipéptidos nativos, sino también aquellos polipéptidos, por ejemplo, enzimas, que han sido modificados por sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos, u otras modificaciones de este tipo para mejorar la actividad, la termoestabilidad, la tolerancia del pH y similares.

[0223] En otro aspecto, en este documento también se divulga un producto proteínico esencialmente libre de

actividad de alfa-xilosidasa que se produce mediante el método anterior.

Formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares

5 [0224] La presente invención también se refiere a una formulación de caldo de fermentación o una composición celular que comprende un polipéptido de la presente invención. El producto de caldo de fermentación comprende  
10 adicionalmente ingredientes adicionales utilizados en el proceso de fermentación, tales como, por ejemplo, células (incluyendo las células huésped que contienen el gen que codifica el polipéptido de la presente invención, que se usan para producir el polipéptido de interés), restos celulares, biomasa, medios de fermentación y/o  
15 productos de fermentación. En algunas formas de realización, la composición es un caldo entero de células inactivadas que contiene ácido(s) orgánico(s), células inactivadas y/o restos celulares, y medio de cultivo.

[0225] El término "caldo de fermentación", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación  
15 producida por fermentación celular que se somete a una recuperación y/o purificación nula o mínima. Por ejemplo, los caldos de fermentación se producen cuando los cultivos microbianos se cultivan hasta la saturación, se incuban en condiciones limitativas de carbono para permitir la síntesis de proteínas (por ejemplo, la expresión de enzimas por células huésped) y se secretan en un medio de cultivo celular. El caldo de fermentación puede contener contenidos no fraccionados o fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la  
20 fermentación. Típicamente, el caldo de fermentación no está fraccionado y comprende el medio de cultivo agotado y los restos celulares presentes después de las células microbianas (por ejemplo, células de hongos filamentosos) se eliminan, por ejemplo, por centrifugación. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación contiene medio de cultivo celular gastado, enzimas extracelulares y células microbianas viables y/o no viables.

[0226] En una forma de realización, la formulación de caldo de fermentación y las composiciones celulares  
25 comprenden un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal del mismo y un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal del mismo. En una forma de realización específica, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal del mismo, o una  
30 mezcla de dos o más de los anteriores y el segundo componente ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal del mismo, o una mezcla de dos o más de los anteriores.

[0227] En un aspecto, la composición contiene uno o varios ácido(s) orgánico(s) y, opcionalmente, además  
35 contiene células inactivadas y/o restos celulares. En una forma de realización, las células inactivadas y/o los restos celulares se eliminan de un caldo completo con inactivación celular para proporcionar una composición que está libre de estos componentes.

[0228] Las formulaciones de caldo de fermentación o las composiciones celulares pueden comprender además  
40 un agente conservante y/o antimicrobiano (por ejemplo, bacteriostático), que incluye, pero no se limita a, sorbitol, cloruro de sodio, sorbato de potasio y otros conocidos en la técnica.

[0229] El caldo entero o composición con inactivación celular puede contener los contenidos no fraccionados de  
45 los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación. Típicamente, el caldo entero o composición con inactivación celular contiene el medio de cultivo gastado y los restos celulares presentes después de que las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas) se hayan cultivado hasta la saturación, incubadas en condiciones limitativas de carbono para permitir la síntesis de proteínas. En algunas formas de realización, el caldo entero o composición con inactivación celular contiene el medio de cultivo celular gastado, las enzimas extracelulares y las células fúngicas filamentosas inactivadas. En algunas formas de realización, las  
50 células microbianas presentes en el caldo entero o composición con inactivación celular se pueden permeabilizar y/o lisar usando métodos conocidos en la técnica.

[0230] Un caldo completo o composición celular como se describe en este documento es típicamente un líquido,  
55 pero puede contener componentes insolubles, tales como células inactivadas, restos celulares, componentes de medios de cultivo, y/o enzimas insolubles. En algunas formas de realización, los componentes insolubles se pueden eliminar para proporcionar una composición líquida clarificada.

[0231] Las formulaciones de caldo entero y las composiciones celulares de la presente invención se pueden  
60 producir mediante un método descrito en WO 90/15861 o WO 2010/096673.

60 Composiciones enzimáticas

[0232] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente  
65 invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas con dicho polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de  $\alpha$ -xilosidasa de la composición se ha incrementado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.



[0233] En un aspecto, la composición comprende un polipéptido aislado que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa, seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (a) un polipéptido que tiene al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3;
- (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de astringencia alta o en condiciones de astringencia muy alta con:
- 10 (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; y/o  
(iii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i);
- (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91 %, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia codificante de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1;
- 15 (d) una variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3; y
- 20 (e) un fragmento de un polipéptido de (a), (b), (c) o (d), que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa.

[0234] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

25 [0235] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 86% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0236] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 87% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

30 [0237] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 88% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0238] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 89% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

35 [0239] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 90% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0240] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 91% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0241] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 92% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

45 [0242] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 93% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0243] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 94% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

50 [0244] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 95% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0245] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 96% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0246] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 97% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

60 [0247] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 98% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0248] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene al menos un 99% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

65

[0249] Una forma de realización de la invención es una composición que comprende un polipéptido aislado que tiene una identidad de secuencia del 100% con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3.

[0250] En un aspecto, la composición comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 3 o una variante alélica de la misma; o es un fragmento de la misma que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa. En otro aspecto, la composición comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3. En otro aspecto adicional, la composición comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3. En otro aspecto, la composición comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 160 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 5 a 154 de la SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 10 a 149 de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 160 de la SEQ ID NO: 3, los aminoácidos 5 a 154 de la SEQ ID NO: 3, o los aminoácidos 10 a 149 de la SEQ ID NO: 3.

[0251] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden polipéptidos aislados que tienen actividad de  $\alpha$ -xilosidasa que son codificados por polinucleótidos que se hibridan en condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, y/o (ii) la cadena complementaria de longitud completa de (i) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd edition, Cold Spring Harbor, New York.).

[0252] La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden polipéptidos aislados que difieren en no más de cien residuos de aminoácidos, por ejemplo, en noventa aminoácidos, en ochenta aminoácidos, en setenta aminoácidos, en sesenta aminoácidos, en cincuenta aminoácidos, en cuarenta aminoácidos, en treinta aminoácidos, en veinticinco aminoácidos, en veinte aminoácidos, en quince aminoácidos, en diez aminoácidos, en ocho aminoácidos, en siete aminoácidos, en seis aminoácidos, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos y en un aminoácido del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0253] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden variantes que comprenden una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o una secuencia homóloga de los mismos. El número total de posiciones que tienen sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos en la SEQ ID NO: 3 no es más de 100, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de naturaleza menor, es decir, sustituciones, inserciones o eliminaciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o a la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; extensiones pequeñas en los extremos amino o carboxilo terminales, tales como un residuo de metionina en el extremo amino terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0254] Las formas de realización indicadas anteriormente con respecto a la SEQ ID NO: 3 se aplican correspondientemente a composiciones que comprenden o consisten en polipéptidos como se proporciona en la SEQ ID NO: 2.

[0255] Las formas de realización indicadas anteriormente con respecto a la SEQ ID NO: 3 se aplican de manera correspondiente a las composiciones que comprenden o consisten en polipéptidos como se proporciona en la SEQ ID NO: 4.

[0256] Las formas de realización indicadas anteriormente con respecto a la SEQ ID NO: 3 se aplican de manera correspondiente a las composiciones que comprenden o consisten en polipéptidos como se proporciona en la SEQ ID NO: 5.

[0257] Las composiciones pueden comprender  $\alpha$ -xilosidasa de la presente invención como el principal componente enzimático, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, proteasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas.

[0258] La(s) enzima(s) adicional(es) pueden ser producidas, por ejemplo, por un microorganismo tal como bacterias u hongos o por plantas o por animales. Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. La  $\alpha$ -xilosidasa se puede estabilizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

[0259] Las composiciones pueden comprender un polipéptido de la presente invención como el principal

componente enzimático, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, las composiciones pueden comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como una o más (por ejemplo, varias) enzimas seleccionadas del grupo que consiste en hidrolasa, isomerasa, ligasa, liasa, oxidorreductasa o transferasa, por ejemplo, una alfa-galactosidasa, alfa-glucosidasa, aminopeptidasa, amilasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, beta-xilosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, glucoamilasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas.

5 [0260] Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Las composiciones se pueden estabilizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

15 [0261] A continuación se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de la presente invención. La dosificación de la composición y otras condiciones bajo las cuales se usa la composición se pueden determinar en función de métodos conocidos en la técnica.

Uso de  $\alpha$ -xilosidasas de la invención en pienso para animales

20 [0262] El término animal incluye todos los animales. Ejemplos de animales son los no rumiantes y los rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras y ganado bovino, por ejemplo ganado para carne, vacas y terneros jóvenes. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo cerdos o ganado porcino (incluyendo, entre otros, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollo (incluidos, entre otros, pollos de engorde, gallinas ponedoras); caballos (incluidos, entre otros, de sangre caliente, sangre fría y sangre templada), terneros jóvenes; y peces (incluidos, entre otros, salmón, trucha, tilapia, bagre y carpas); y crustáceos (incluidos, entre otros, gambas y camarones).

30 [0263] El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuada para un animal o destinada a ser ingerida por un animal. En el uso según la invención, la  $\alpha$ -xilosidasa puede suministrarse al animal antes, después o simultáneamente con la dieta. Se prefiere este último modo.

35 [0264] En una forma de realización particular, la  $\alpha$ -xilosidasa, en la forma en la que se agrega al pienso, o cuando se incluye en un aditivo de pienso, está bien definida. Bien definida significa que la preparación de  $\alpha$ -xilosidasa es al menos 50% pura según se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (véase el Ejemplo 12 de WO 01/58275) En otras formas de realización particulares, la preparación de  $\alpha$ -xilosidasa tiene al menos 60, 70, 80, 85, 88, 90, 92, 94, o al menos un 95% de pureza según se determina por este método.

40 [0265] Una preparación de  $\alpha$ -xilosidasa bien definida es ventajosa. Por ejemplo, es mucho más fácil dosificar correctamente en el pienso una  $\alpha$ -xilosidasa que está esencialmente libre de interferir o contaminar otras proteasas u otras proteínas en general. El término dosificar correctamente se refiere en particular al objetivo de obtener resultados estables y constantes, y a la capacidad de optimizar la dosificación en función del efecto deseado.

45 [0266] Para el uso en pienso para animales, sin embargo, la  $\alpha$ -xilosidasa no necesita ser tan pura; puede, por ejemplo, incluir otras enzimas, en cuyo caso se podría denominar una preparación de  $\alpha$ -xilosidasa.

50 [0267] La preparación de  $\alpha$ -xilosidasa puede (a) agregarse directamente al pienso (o usarse directamente en un proceso de tratamiento con proteínas), o (b) puede usarse en la producción de una o más composiciones intermedias tales como aditivos para piensos o premezclas que posteriormente se agregan al pienso (o se usan en un proceso de tratamiento). El grado de pureza descrito anteriormente se refiere a la pureza de la preparación de  $\alpha$ -xilosidasa original, se use de acuerdo con (a) o con (b) anteriores.

55 [0268] Las preparaciones de  $\alpha$ -xilosidasa con purezas de este orden de magnitud se pueden obtener en particular usando métodos de producción recombinantes, mientras que no se obtienen tan fácilmente y también están sujetas a una variación mucho mayor entre lotes cuando la  $\alpha$ -xilosidasa se produce mediante métodos de fermentación tradicionales. Tal preparación de  $\alpha$ -xilosidasa puede, por supuesto, mezclarse con otras enzimas para obtener una preparación con dos o más enzimas purificadas con actividades diferentes o similares.

60 [0269] La proteína del sustrato puede ser una proteína animal, tal como harina de carne y huesos, harina de plumas y/o harina de pescado; o puede ser una proteína vegetal.

65 [0270] La fuente del sustrato es preferentemente de origen vegetal. El término proteínas vegetales como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluya al menos una proteína derivada de un vegetal o que se origine a partir de un vegetal, incluyendo proteínas

modificadas y derivados de proteínas. En formas de realización particulares, el contenido en proteínas de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50 o 60% (p/p).

5 [0271] Las proteínas vegetales pueden derivarse de fuentes de proteínas vegetales que contienen componentes de la pared celular de la galactosa, como las legumbres y los cereales (Bach Knudsen, K. E. (1997). Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology* 67: 319-338), por ejemplo materiales de plantas de las familias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferaeae, Chenopodiaceae y Poaceae, tales como harina de soja, harina de altramuz y harina de semilla de colza. En una forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material procedente de una o más plantas de la familia Fabaceae, por ejemplo soja, altramuz, guisante o alubia. En otra forma de realización particular, la fuente de proteína vegetal es material procedente de una o más plantas de la familia Chenopodiaceae, por ejemplo remolacha, remolacha azucarera, espinaca o quinoa. Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son colza, semillas de girasol, semillas de algodón y repollo. La soja es una fuente de proteína vegetal preferida. Otros ejemplos de fuentes de proteínas vegetales son los cereales como la cebada, el trigo, el centeno, la avena, el maíz, el arroz, el triticale, el sorgo, los granos secos de destilería con solubles (DDGS) y las microalgas.

20 [0272] En una forma de realización particular de un proceso de tratamiento, la(s)  $\alpha$ -xilosidasa(s) en cuestión tiene(n) efecto en (o actúan sobre, o ejercen su influencia hidrolizante o degradante sobre) la arquitectura de la pared celular que contiene xilosidasa de la fuente de proteínas, aumentando con ello la liberación de nutrientes. Esta liberación no se limita a las proteínas, sino que también incluye otros nutrientes tales como almidón, grasa y azúcares de bajo peso molecular almacenados dentro de la pared celular. Para lograr esto, la proteína o fuente de proteína se suspende típicamente en un disolvente, por ejemplo un disolvente acuoso tal como agua, y los valores de pH y temperatura se ajustan teniendo en cuenta las características de la enzima en cuestión. Por ejemplo, el tratamiento puede tener lugar a un valor de pH en el cual la actividad de la  $\alpha$ -xilosidasa real es de al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70 %, 80% o al menos 90%. Asimismo, por ejemplo, el tratamiento puede tener lugar a una temperatura a la cual la actividad de la  $\alpha$ -xilosidasa real es de al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70 %, 80% o al menos 90%. Las indicaciones de actividad porcentual anteriores son relativas a las actividades máximas. La reacción enzimática se continúa hasta que se alcanza el resultado deseado, después de lo cual puede o no detenerse inactivando la enzima, por ejemplo mediante un paso de tratamiento térmico.

35 [0273] En otra forma de realización particular de un proceso de tratamiento de la invención, la acción de la  $\alpha$ -xilosidasa es prolongada, es decir, la  $\alpha$ -xilosidasa se añade a las proteínas vegetales, pero su influencia hidrolizante no se pone en marcha, por así decirlo, hasta más tarde cuando se desee, una vez que se establecen las condiciones de hidrolización adecuadas, o una vez que se inactivan los inhibidores de enzimas, o cualquier otro medio que se pueda haber aplicado para posponer la acción de la enzima.

40 [0274] En una forma de realización, el tratamiento es un pretratamiento de pienso para animales o proteínas para uso en pienso para animales, es decir, las fuentes de proteínas vegetales se hidrolizan antes de la ingesta.

45 [0275] El término mejora del valor nutricional de un pienso para animales significa la mejora de la disponibilidad de nutrientes en el pienso. En esta invención, la mejora de los valores nutricionales se refiere en particular a la mejora de la disponibilidad de la fracción proteica del pienso, lo que conduce a una mayor extracción de proteínas, a mayores rendimientos de proteínas y/o a una mejor utilización de las proteínas. Cuando se aumenta el valor nutricional del pienso, la digestibilidad de la proteína y/o aminoácidos aumenta y la velocidad de crecimiento y/o el aumento de peso y/o la transformación del pienso (es decir, el peso del pienso ingerido en relación con el aumento de peso) del animal pueden mejorar.

50 [0276] La  $\alpha$ -xilosidasa puede agregarse al pienso en cualquier forma, ya sea como una  $\alpha$ -xilosidasa relativamente pura, o en mezcla con otros componentes destinados a la adición a pienso para animales, es decir, en forma de aditivos para piensos, tales como las llamadas premezclas para pienso para animales.

55 [0277] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones para uso en pienso para animales, tales como pienso para animales y aditivos para piensos, por ejemplo premezclas.

[0278] Además de la  $\alpha$ -xilosidasa de la invención, los aditivos para piensos de la invención contienen al menos una vitamina liposoluble y/o al menos una vitamina soluble en agua y/o al menos un oligoelemento, y/o al menos un macromineral.

60 [0279] Además, otros ingredientes aditivos para el pienso opcionales son agentes colorantes, por ejemplo carotenoides tales como betacaroteno, astaxantina y luteína; estabilizantes; aditivos que mejoran el crecimiento y compuestos aromáticos/aromatizantes, por ejemplo creosol, anetol, deca-, undeca- y/o dodeca-lactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, propilideno-ftálico, butilideno-ftálico, capsaicina y/o tanino; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados (PUFA); especies generadoras de oxígeno reactivo; también se puede usar un soporte que puede contener, por ejemplo, 40-50% en peso de fibras de madera, 8-10% en peso de estearina, 4-5% en peso de polvo de cúrcuma, 4-58% en peso de polvo de romero, 22-28% en peso de piedra

caliza, 1-3% en peso de una goma, tal como goma arábica, 5-50% en peso de azúcar y/o almidón y 5-15% en peso de agua.

5 [0280] Un pienso o un aditivo para piensos de la invención también puede comprender al menos otra enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

10 [0281] En una forma de realización particular, el pienso o un aditivo para piensos de la invención también comprende una proteasa (EC 3.4).

[0282] En una forma de realización particular, el pienso o un aditivo para piensos de la invención también comprende una fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26).

15 [0283] En una forma de realización particular, el pienso o un aditivo para piensos de la invención también comprende una xilanasas (EC 3.2.1.8).

20 [0284] Un pienso o un aditivo para piensos de la invención también puede comprender al menos un microbio probiótico o de alimentación directa (DFM) opcionalmente junto con una o más enzimas diferentes seleccionadas de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xilanasas (EC 3.2.1.8); galactanasas (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasas (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

25 [0285] El DFM se puede agregar al pienso para animales de manera que la dosis diaria de DFM esté entre 1x10<sup>5</sup> UFC y 1x10<sup>13</sup> UFC, preferiblemente entre 1x10<sup>6</sup> UFC y 1x10<sup>12</sup> UFC, más preferiblemente entre 1x10<sup>7</sup> UFC y 1x10<sup>11</sup> UFC e incluso más preferiblemente entre 5x10<sup>7</sup> UFC y 1x10<sup>10</sup> UFC. Alternativamente, el DFM puede agregarse al pienso para animales de manera que la concentración de DFM en el pienso esté entre 1x10<sup>3</sup> UFC/g de pienso y 1x10<sup>8</sup> UFC/g de pienso, preferiblemente entre 5x10<sup>3</sup> UFC/g de pienso y 1x10<sup>7</sup> UFC/g de pienso, más preferiblemente entre 1x10<sup>4</sup> UFC/g de pienso y 5x10<sup>6</sup> UFC/g de pienso e incluso más preferiblemente entre 2.5x10<sup>4</sup> UFC/g de pienso y 1x10<sup>6</sup> UFC/g de pienso.

35 [0286] El microbio alimentado directamente puede ser una bacteria de uno o más de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Megasphaera* o cualquier combinación de los mismos, preferiblemente de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* spp, y *Pediococcus* spp, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Propionibacterium thoenii*, *Lactobacillus farciminus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium butyricum*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, *Megasphaera elsdenii*, *Propionibacteria* sp y más preferiblemente de las cepas de *Bacillus subtilis* 3A-P4 (PTA-6506); 15A-P4 (PTA-6507); 22C-P1 (PTA-6508); 2084 (NRRL B-500130); LSSA01 (NRRL-B-50104); BS27 (NRRL B-501 05); BS 18 (NRRL B-50633); y BS 278 (NRRL B-50634).

45 [0287] En una forma de realización particular, estas otras enzimas están bien definidas (como se ha definido anteriormente). En una forma de realización particular, el pienso o un aditivo para piensos de la invención también comprende una xilanasas (EC 3.2.1.8).

50 [0288] Algunos ejemplos de péptidos antimicrobianos (AMP) son CAP18, Leucocina A, Tritripina, Protegrina-1, Thanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina y Ovispirina tales como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas y Estatinas, que incluyen los compuestos y polipéptidos divulgados en WO 03/044049 y WO 03/048148, así como variantes o fragmentos de los anteriores que conservan la actividad antimicrobiana.

55 [0289] Algunos ejemplos de polipéptidos antifúngicos (AFP) son los péptidos *Aspergillus giganteus* y *Aspergillus niger*, así como variantes y fragmentos de los mismos que retienen actividad antifúngica, como se describe en WO 94/01459 y WO 02/090384.

60 [0290] Algunos ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son los ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosohexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

[0291] Algunos ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

65 [0292] Por lo general, las vitaminas liposolubles y solubles en agua, así como los oligoelementos, forman parte de la denominada premezcla destinada a ser añadida al pienso, mientras que los macrominerales generalmente

se añaden por separado al pienso. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando está enriquecido con una  $\alpha$ -xylosidasa de la invención, es un aditivo para piensos de la invención.

5 [0293] En una forma de realización particular, el aditivo para piensos de la invención está destinado a ser incluido (o prescrito como que debe incluirse) en dietas para animales o pienso a niveles de 0,01 a 10,0%; más particularmente de 0,05 a 5,0%; o 0,2 a 1,0% (% significa g de aditivo por 100 g de pienso). Esto es así en particular para las premezclas.

10 [0294] Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

Ejemplos de vitaminas liposolubles son la vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo la vitamina K3.

15 [0295] Los ejemplos de vitaminas hidrosolubles son la vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo Ca-D-pantotenato.

[0296] Ejemplos de oligoelementos son manganeso, zinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.

20 [0297] Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

[0298] Los requisitos nutricionales de estos componentes (ejemplificados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la Tabla A de WO 01/58275. Requisito nutricional significa que estos componentes se deben proporcionar en la dieta en las concentraciones indicadas.

25 [0299] Alternativamente, el aditivo para piensos de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A de WO 01/58275. Al menos uno significa uno, uno o más de uno, dos, tres o cuatro, y así sucesivamente hasta los trece, o hasta los quince componentes individuales. Más específicamente, este al menos un componente individual está incluido en el aditivo de la invención en una cantidad tal que proporciona una concentración de pienso dentro del intervalo indicado en la columna cuatro, o  
30 columna cinco, o columna seis de la Tabla A.

[0300] En otra forma de realización más, el aditivo para piensos para animales de la invención comprende al menos una de las siguientes vitaminas, preferiblemente para proporcionar una concentración en pienso dentro de los intervalos especificados en la Tabla 1 a continuación (para dietas de lechones y dietas de pollos de  
35 engorde, respectivamente).

Tabla 1: recomendaciones típicas de vitaminas

Vitamina	Dieta de lechón	Dieta de pollo de engorde
Vitamina A	10, 000-15,000 UI/kg de pienso	8-12,500 UI/kg de pienso
Vitamina D3	1800-2000 UI/kg de pienso	3000-5000 UI/kg de pienso
Vitamina E	60-100 mg/kg de pienso	150-240 mg/kg de pienso
Vitamina K3	2-4 mg/kg de pienso	2-4 mg/kg de pienso
Vitamina B1	2-4 mg/kg de pienso	2-3 mg/kg de pienso
Vitamina B2	6-10 mg/kg de pienso	7-9 mg/kg de pienso
Vitamina B6	4-8 mg/kg de pienso	3-6 mg/kg de pienso
Vitamina B12	0,03-0,05 mg/kg de pienso	0,015-0,04 mg/kg de pienso
Niacina (Vitamina B3)	30-50 mg/kg de pienso	50-80 mg/kg de pienso
Ácido pantoténico	20-40 mg/kg de pienso	10-18 mg/kg de pienso
Ácido fólico	1-2 mg/kg de pienso	1-2 mg/kg de pienso
Biotina	0,15-0,4 mg/kg de pienso	0,15-0,3 mg/kg de pienso
Cloruro de colina	200-400 mg/kg de pienso	300-600 mg/kg de pienso

40 [0301] La presente invención también se refiere a composiciones de pienso para animales. Las composiciones o las dietas de pienso para animales tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas para aves y cerdos se pueden caracterizar como se indica en la Tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas para peces se pueden caracterizar como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Además, tales dietas de peces generalmente tienen un contenido de grasa bruta de 200-310 g/kg. WO 01/58275 corresponde a US 09/779334.

45 [0302] Una composición de pienso para animales de acuerdo con la invención tiene un contenido de proteína bruta de 50-800 g/kg, y además comprende al menos una  $\alpha$ -xilosidasa como se reivindica en este documento.

50 [0303] Además, o en alternativa (al contenido de proteína bruta indicado anteriormente), la composición de pienso para animales de la invención tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un

contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

5 [0304] En formas de realización particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 o 5 en la Tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

10 [0305] La proteína bruta se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor de 6,25, es decir proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método de Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

15 [0306] La energía metabolizable se puede calcular sobre la base de la publicación del NRC Nutrient requirements in swine, ninth revised edition 1988, subcommittee on swine nutrition, committee on animal nutrition, board of agriculture, national research council. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y European Table of Energy Values for Poultry Feed-stuffs, Spelderholt centre for poultry research and extension, 7361 DA Beekbergen, The Netherlands. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

20 [0307] El contenido nutricional de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en dietas completas para animales se calcula sobre la base de tablas de alimentación tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid in voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

25 [0308] En una forma de realización particular, la composición de pienso para animales de la invención contiene al menos una proteína vegetal como se ha definido anteriormente.

30 [0309] La composición de pienso para animales de la invención también puede contener proteína animal, tal como carne y harina de huesos, harina de plumas, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%. La composición de pienso para animales de la invención también puede comprender granos de destilería secos con solubles (DDGS), típicamente en cantidades de 0-30%.

35 [0310] En otras formas de realización particulares, la composición de pienso para animales de la invención contiene 0-80% de maíz; y/o 0-80% de sorgo; y/o 0-70% de trigo; y/o 0-70% de cebada; y/o 0-30% de avena; y/o 0-40% harina de soja; y/o harina de pescado al 0-25%; y/o 0-25% de harina de carne y hueso; y/o 0-20% de suero de leche.

40 [0311] Las dietas para animales se pueden fabricar por ejemplo como pienso en harina (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, los piensos molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas y minerales esenciales de acuerdo con las especificaciones para la especie en cuestión. Las enzimas se pueden agregar como formulaciones enzimáticas sólidas o líquidas. Por ejemplo, para un pienso en harina se puede agregar una formulación enzimática sólida o líquida antes o durante el paso de mezcla de ingredientes. Para el pienso granulado, también se puede agregar la preparación de  $\alpha$ -xilosidasa/enzima (líquida o sólida) antes o durante el paso del ingrediente del pienso. Típicamente, después del paso de granulación se agrega una preparación líquida de  $\alpha$ -xilosidasa/enzima. La enzima también se puede incorporar en un aditivo o premezcla para pienso.

45 [0312] La concentración final de enzima en la dieta está dentro del rango de 0,01-200 mg de proteína enzimática por kg de dieta, por ejemplo en el rango de 0,5-25 mg de proteína enzimática por kg de dieta animal.

50 [0313] La  $\alpha$ -xilosidasa debería aplicarse, por supuesto, en una cantidad efectiva, es decir, en una cantidad adecuada para mejorar la hidrólisis de las proteínas, la digestibilidad de proteínas y aminoácidos, y/o para mejorar el valor nutricional del pienso. En la actualidad se contempla que la enzima se administre en una o más de las siguientes cantidades (rangos de dosificación): 0,01 - 200; 0,01-100; 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50; o 0,10-10 - todos estos rangos están en mg de proteína  $\alpha$ -xilosidasa por kg de pienso (ppm).

55 [0314] Para determinar los mg de proteína  $\alpha$ -xilosidasa por kg de pienso, la  $\alpha$ -xilosidasa se purifica a partir de la composición de pienso, y la actividad específica de la  $\alpha$ -xilosidasa purificada se determina usando un ensayo relevante (véase actividad de  $\alpha$ -xilosidasa, sustratos y ensayos). La actividad de  $\alpha$ -L- galactosidasa de la composición de pienso como tal también se determina usando el mismo ensayo, y en función de estas dos determinaciones se calcula la dosificación en mg de proteína  $\alpha$ -xilosidasa por kg de pienso.

60 [0315] Los mismos principios se aplican para determinar los mg de proteína  $\alpha$ -xilosidasa en los aditivos para pienso. Por supuesto, si se dispone de una muestra de la  $\alpha$ -xilosidasa utilizada para preparar el aditivo de pienso o el pienso, la actividad específica se determina a partir de esta muestra (no es necesario purificar la  $\alpha$ -xilosidasa de la composición de pienso o el aditivo).

65

## Péptido señal

5 [0316] También se describe un polinucleótido aislado que codifica un péptido señal que comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID NO: 2. Los polinucleótidos pueden comprender además un gen que codifica una proteína, que está operativamente unida al péptido señal. La proteína es preferiblemente foránea al péptido señal. En un aspecto, el polinucleótido que codifica el péptido señal son los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID NO: 1.

10 Construcciones de ácidos nucleicos, vectores de expresión, células huésped recombinantes y métodos para la producción de  $\alpha$ -xilosidasa

15 [0317] Se describen construcciones de ácidos nucleicos, vectores de expresión y células huésped recombinantes que comprenden tales polinucleótidos que codifican la  $\alpha$ -xilosidasa de la invención. También se describen métodos para producir una  $\alpha$ -xilosidasa, que comprenden (a) cultivar una célula huésped recombinante que comprende dicho polinucleótido; y (b) recuperar la proteína.

20 [0318] La proteína puede ser nativa o heteróloga respecto de una célula huésped. El término "proteína" no se refiere aquí a una longitud específica del producto codificado y, por lo tanto, abarca péptidos, oligopéptidos y polipéptidos. El término "proteína" también abarca dos o más polipéptidos combinados para formar el producto codificado. Las proteínas también incluyen polipéptidos híbridos y polipéptidos fusionados.

25 [0319] Preferiblemente, la proteína es una hormona, enzima, receptor o parte del mismo, anticuerpo o parte del mismo, o reportero. Por ejemplo, la proteína puede ser una  $\alpha$ -xilosidasa, hidrolasa, isomerasa, ligasa, liasa, oxidoreductasa o transferasa, por ejemplo una alfa-galactosidasa, alfa-glucosidasa, aminopeptidasa, amilasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, beta-xilosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celobiohidrolasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, glucoamilasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa.

30 [0320] Preferiblemente, la proteína es una  $\alpha$ -xilosidasa.

[0321] El gen puede obtenerse de cualquier fuente procarionta, eucariota u otra fuente.

35 [0322] La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

**Ejemplos**

40 Cepas

[0323] Se ha hecho referencia al depósito disponible públicamente de la cepa microbiana *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483) depositado en la ATCC en 1933 por Eggerth (Eggerth AH, Gagnon BH. The bacteroides of human feces. J. Bacteriol. 25:389-413, 1933).

**Ejemplo 1:**

Construcción de plásmidos y producción de proteínas

50 [0324] Para producir construcciones de proteínas, secuencias de ADN que codifican GH31 (BACOVA 03422; depósito A7LZZ5) y GH95 (BACOVA\_03438; depósito A7M011) de *Bacteroides ovatus* se amplificaron por PCR de ADN genómico de *B. ovatus* ATCC8483 usando cebadores adecuados. GH31 se clonó en vector pRSET\_A (Invitrogen) digerido por DamHI y HindIII. El fragmento de ADN amplificado que codifica GH95 se clonó en pET21a (Novagen) restringido con NdeI y XhoI.

55 [0325] Se produjeron proteínas recombinantes solubles inoculando *E. coli* recombinante (BL21; Novagen) en medio LB (1 L) en matraces de 2 L suplementados con ampicilina (50  $\mu$ g/mL) e incubando los cultivos a 37 ° C con agitación (200 rpm) hasta que la OD600 alcanzó 0,4. Se añadió isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido a la concentración final de 1 mM para inducir la producción de proteínas, y el cultivo se incubó durante 5 h adicionales a 37°C. Las células se recogieron por centrifugación (ángulo fijo) a 5000 g/10 min/4°C, se resuspendieron en 10 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, que contenía 300 mM de NaCl (tampón A) por litro de cultivo y se rompieron por sonicación. Tras la clarificación del lisado celular mediante centrifugación a 15000 g/30 min/4°C, el polipéptido se purificó mediante cromatografía de afinidad de metal inmovilizado usando resina Talon (Clontech). Las proteínas se eluyeron con tampón A que contenía 150 mM de imidazol (GH31 en la figura 3 y GH95 en la figura 4). *B. ovatus* se dializó con tampón Tris-HCl 20mM, que contenía 50mM de NaCl. GH95 de *B. ovatus* se dializó contra tampón Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7,5.



[0326] La secuencia de ADN clonada de BACOVA 03422 se proporciona como la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos deducida como SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos madura se proporciona como SEQ ID NO: 3

5

## Ejemplo 2:

Caracterización bioquímica de BACOVA\_03422 GH31

10 *Fuentes de carbohidratos utilizadas:*

[0327] Los arabinoxilanos y xilooligosacáridos de trigo y centeno fueron de Megazyme (Megazyme International Ireland). Los xilanos de abedul y cascarilla de avena y todos los monosacáridos fueron de Sigma. El xilano de salvado de maíz fue una amablemente proporcionado por los doctores Kevin Hicks y Madhav Yadav (USDA).

15

*Cromatografía en Capa Fina (TLC):*

[0328] La actividad de las enzimas GH31 frente a una gama de xilanos decorados se evaluó inicialmente mediante TLC. Se incubaron xilanos (1% p/v final) de centeno, trigo, abedul, avena y salvado de maíz con 0,5  $\mu$ M de cada enzima. Las reacciones se llevaron a cabo en K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, ácido cítrico 120 mM, pH 6,5. Los polisacáridos se incubaron con enzimas durante 5 horas a 37 ° C. A continuación, se cargaron muestras (de 6  $\mu$ l cada una) a intervalos de 1 cm en la placa de TLC y se secaron usando un secador de pelo después de cada carga de 2  $\mu$ l. La placa de TLC se colocó luego en un tanque de vidrio de 1 l que contenía tampón de migración (butanol/ácido acético/agua a 2:2:1), hasta una profundidad de 0,5 cm y se selló con una placa de vidrio. Cuando el tampón de funcionamiento alcanzó ~ 1 cm desde la parte superior de la placa, la placa se extrajo, se secó con un secador de pelo y se sumergió durante unos segundos en un reactivo de ácido sulfúrico de orcinol (ácido sulfúrico/etanol/agua 3:70:20 v/v , orcinol 1%), y se secó a 120 ° C hasta que se revelaron los azúcares (~5-10min).

20

25

30 [0329] Actividad de *B. Ovatius* GH31, BACOVA\_03422

[0330] Un análisis mediante TLC reveló que BACOVA\_03422 GH31 no era activa contra silanos decorados de trigo, centeno, espelta de avena o madera de abedul, pero que la enzima liberaba un único producto de xilano de salvado de maíz que co-migraba con D-xilosa (Fig. 2).

35

*Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):*

[0331] La HPLC se usó para cuantificar los productos de la hidrólisis de xilano de maíz mediante mediante la GH31, usando una columna analítica de intercambio aniónico CARBOPAC™ PA-100 (Dionex) equipada con una columna de protección CARBOPAC™ PA-100. El sistema totalmente automático tenía un tamaño de bucle de 100  $\mu$ l, caudal de 1,0 ml/min, presión de -2000 psi y azúcares detectados por detección amperométrica pulsada (PAD). La configuración de la PAD fue E1 = +0,05, E2 = +0,6 y E3 = -0,6. Las condiciones de elución usadas fueron 0-5 minutos de 100 mM de NaOH, 5-15 minutos 100 mM de NaOH con gradiente de acetato sódico 0-75 mM y 15-25 minutos de 100 mM de NaOH que contenía 75 mM de acetato sódico. Antes y después de cada paso, la columna se lavó con 500 mM de acetato sódico durante 10 minutos y luego con 500 mM de hidróxido sódico durante 5 minutos y luego se equilibró con 100 mM de hidróxido sódico durante 10 minutos.

40

45

[0332] Las reacciones enzimáticas se realizaron en 50 mM de tampón de PC, pH 6,5 que contenía 1 mg/ml de BSA. El volumen de reacción final se calculó para permitir que se analizaran 4-8 alícuotas de cada reacción, que se inició mediante la adición de la enzima adecuadamente diluida (1/100 del volumen final). Las reacciones se terminaron llevando a ebullición alícuotas durante 10 min. Los datos fueron recogidos y analizados utilizando el software XChrom V.2.04 (LabSystems) mediante un VG Chromatography Server (Fisons Instruments).

50

[0333] El análisis mediante HPLC se usó para investigar más el producto de *B. ovatus* GH31 liberado a partir de xilano de salvado de maíz y para cuantificar la velocidad de liberación del producto. Los datos (Figura 3) revelaron que la enzima liberaba un único producto principal de xilano de maíz con el tiempo de retención correspondiente al estándar de D-xilosa. Para confirmar que la enzima GH31 libera xilosa, la muestra se enriqueció con estándar de D-xilosa y se analizó mediante HPLC (Figura 4). Como las enzimas de GH31 se dirigen a los enlaces  $\alpha$ -D-glucosídicos y no se observó actividad frente a D-xilo-oligosacáridos enlazados en  $\beta$  de X2-X6 (no mostrados), estos datos revelan que BACOVA\_03422 es  $\alpha$ -D-xilosidasa activa en xilano de salvado de maíz.

55

60

[0334] La actividad de la enzima GH31 de *B. ovatus* (BACOVA\_03422) se comparó luego con una  $\alpha$ -xilosidasa GH31 previamente caracterizada de *C. japonicus* (ACE86259) que es activa en oligosacáridos de xiloglucano. Los resultados (Figuras 5 y 6) muestran que, aunque la enzima de *C. japonicus* es capaz de liberar xilosa de xilano de salvado de maíz, la actividad de GH31 de *B. ovatus* en la misma cantidad de sustrato polimérico fue

65

aproximadamente 100 veces mayor, lo que demuestra que la actividad de la  $\alpha$ -xilosidasa frente axilano de maíz no es una propiedad general de las enzimas GH31.

**Ejemplo 3:**

5 Desalmidonado de maíz y extracción de goma de fibra de maíz (CFG)

Maíz desalmidonado

10 [0335] Se mezclaron 107 kg de maíz pre-molido (<1,0 mm) con 253 kg de agua a 53°C. La mezcla se calentó a 95°C y el pH se ajustó a 6,2 con NaOH 1M. Se añadieron 1,12 kg, 120 L de Termamyl y la reacción se mantuvo a alrededor de 90 °C durante 3 horas. Después de 3 horas, se añadió agua fría hasta un peso de reacción total de 600 kg. La separación del sólido y el líquido se realizó con un decantador Westfalia, CA-225-110, 4950 rpm, flujo 600 L/hora. La fracción de fibra sólida se volvió a suspender y se separó dos veces con agua hasta un peso total de 600 kg seguido de separación como se ha descrito anteriormente. La fracción de fibra final se dividió en porciones más pequeñas y se liofilizó durante 3-4 días.

Extracción de goma de fibra de maíz

20 [0336] Se añadieron 20 g de maíz desalmidonado a 200 ml de agua de MilliQ™ en ebullición junto con 0,8 g de NaOH y 0,8 g de Ca(OH)2. La mezcla se mantuvo durante 1 hora a 96°C y luego se centrifugó durante 20 minutos a 6000 g.

25 [0337] El sobrenadante tenía aspecto lechoso y graso y, por lo tanto, las grasas se extrajeron mediante agitación con hexano (1 parte de hexano por 4 partes de goma de fibra de maíz). Después de un tiempo de reposo, el hexano se eliminó mediante pipeteo.

30 [0338] Se realizó una segunda extracción (CFG2) disolviendo el sedimento en 200 ml de NaOH 1M. La mezcla se mantuvo durante 1 hora a 96°C y luego se centrifugó durante 20 min a 6000 g y el sobrenadante se ajustó a pH 6 con 4M de HCl.

35 [0339] Ambas fracciones de CFG se concentraron usando un rotavapor y se precipitaron en EtOH a una concentración final del 90%. El sedimento del NaOH 0,1 M se denominará a partir de ahora CFG1. Debido al alto pH en el extracto de NaOH 1 M (CFG2), esta fracción se dializó en un cilindro de medición de 2 L con agua desionizada, con el grifo goteando durante la noche usando una membrana de diálisis de 3 kDa.

40 [0340] Antes de los ensayos de aplicación, tanto CFG1 como CFG2 se centrifugaron a 25000 g durante 25 min y se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,44  $\mu$ m. La materia seca en las fracciones de CFG2 se determinó con un Mettler Toledo HR73.

Hidrólisis enzimática de la goma de fibra de maíz

[0341] La hidrólisis enzimática se realizó usando la fracción de CFG2 (véase arriba).

45 [0342] Los ensayos de 400  $\mu$ L se llevaron a cabo a 40 ° C en un termomezclador Eppendorph Thermomixer con agitación, 1200 rpm durante 17 horas y las reacciones se detuvieron mediante calor a 97 ° C durante 10 min. La configuración del ensayo se puede encontrar en la Tabla 1. Se realizaron siete reacciones diferentes en paralelo y las enzimas en las respectivas muestras se pueden encontrar en la Tabla 2.

Tabla 2.

	$\mu$ L
CFG2 2,3% MS	350
0,25 M Na citrato pH6	20
Enzima <sup>a</sup>	10
MilliQ	a 400
<sup>a</sup> 10 $\mu$ L por enzima. Dosificación enzimática: GH31, 0.7 g/L; GH95, 0,7 g/L; UltraFlo L 8% (v/v)	

Tabla 2.

Muestra	Enzimas en muestras
1	GH31*
2	GH95**
3	GH31 + GH95
4	UltraFlo L + GH31

5	UltraFlo L + GH95
6	UltraFlo L + GH31 + GH95
7	UltraFlo L
*GH31 es la $\alpha$ -xilosidasa descrita y reivindicada en esta solicitud	
**GH95 es la $\alpha$ -L-galactosidasa descrita en nuestra solicitud de patente pendiente complementaria depositada simultáneamente respecto a esta solicitud	

[0343] UltraFlo L es un producto comercial de Novozymes A/S.

Análisis por HPLC de los monosacáridos producidos

5

[0344] Los sobrenadantes se analizaron en un Dionex ICS-5000 mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) usando una columna analítica y de protección CarboPac-20. El sistema estaba controlado por Chromeleon v. 6.8. Los monosacáridos liberados se cuantificaron frente a una curva estándar de 6 puntos de arabinosa, galactosa, glucosa y xilosa desde 0,0002-0,02 g/l. Se inyectaron 25  $\mu$ l de cada muestra usando el programa de la Tabla 3. Los eluyentes se desgasificaron por burbujeo de helio durante 10 minutos y tenían la siguiente composición: A, agua de MilliQ; B, NaOH 0,5 M; C, NaOAc 0,5 M ; D, NaOAc 60 mM. Las muestras 1-3 se diluyeron a 1:50 y las muestras 4-7 se diluyeron a 1: 200, ambas en agua, antes de la inyección.

15

Tabla 3. Programa de eluyente PA-20 con un flujo de 0,5 ml/min.

Min	Eluyente (%)				Curva
	A	B	C	D	
0-8,5	80	0	0	20	5
8,5-25	80-50	0-30	20	0	4
25-27	0-100	0	100-0	0	9
27-40	80	0	0	20	5

[0345] GH31 libera xilosa de goma de fibra de maíz. GH31 parece contribuir a la hidrólisis lograda por UltraFlo L.

[0346] Los datos mostrados en las Figuras 7 y 8 demuestran claramente que GH31 podría usarse para ayudar en la degradación del xilano de maíz así como para liberar monosacáridos específicos de xilano de maíz.

#### Ejemplo 4:

25 Material y métodos

##### Sustratos

[0347]

30

a) Maíz molido (granos molidos para pasar un tamiz de 0,5 mm)

b) Maíz desalmidonado preparado industrialmente (IPDM) -maíz molido se trató con amilasa, Termamyl® de Novozymes A/S durante 1,25 horas a 92-95 ° C y luego se centrifugó. El residuo se lavó 3 veces con agua del grifo (temperatura 13 ° C) y finalmente se liofilizó antes de su uso. A partir de 107 kg de material de partida, obtuvimos 64,5 kg (antes de la liofilización) dando como resultado aproximadamente 20 kg de material seco al aire.

35

c) IPDM tratado con NaOH: se agitó IDPM con NaOH 0,2 M a temperatura ambiente durante 6 h. El pH se ajustó a 5,5 después de las 6 h y se lavó 5 veces con agua del grifo, antes de secarse con acetona en el laboratorio. A partir de estudios previos, se ha determinado que este tratamiento de maíz con NaOH elimina el ácido acético y el ácido ferúlico del maíz molido.

40

##### Métodos y protocolos

[0348] Las muestras se incubaron en tubos de ensayo de vidrio a 40 ° C durante 4 h, usando tampón NaAc (pH 5). Se centrifugaron; el sobrenadante se recogió para el ensayo de xilosa (determinación de xilano soluble como xilosa) para las muestras h-m (Tabla 4). Se analizaron pequeñas alícuotas de los sobrenadantes para determinar el contenido de monosacáridos y oligosacáridos utilizando un método implementado por Dionex (Tabla 1 muestras h-m)

45

[0349] Se analizaron residuos de las muestras a-g (Tabla 4) para detectar monosacáridos usando el método NSP para fibra insoluble.

50

[0350] 200 mg de maíz desalmidonado (DC) FFS-2013-00063/maíz desalmidonado tratado con álcali FFS-2013-

00064

Condiciones

5 [0351]

4,9/4,8 ml tampón NaAc incl Ca<sup>++</sup> pH 5  
100/200 ul de enzima  
4 horas a 40 ° C

10

Tabla 4

	Tratamiento	Maíz molido	Maíz desalmidonado preparado industrialmente (IPDM)	IPDM tratado con NaOH	NSP	Xilosa/ Dionex
a	Control	X	x	x	x	
b	GH10+GH11	X			x	
c	GH10+GH11+GH43+GH51	X			x	
d	GH10+GH11+GH43+GH51+GH31	X			x	
e	GH10+GH11+GH43+GH51+GH95	X			x	
f	GH10 + GH11 + GH43 + GH51 + GH31 + GH95	X			x	
g	GH10 + GH11 + GH43 + GH51 + GH31 + GH95 + Ultraflo	X			x	
h	GH31		x	x		x
i	GH95		x	x		x
j	GH11+GH43+GH51		x	x		x
k	GH11+GH43+GH51+GH31		x	x		x
l	GH11+GH43+GH51+GH95		x	x		x
m	GH11+GH43+GH51+GH31+GH95		x	x		x

15

Tabla 5. Efecto de GH31 sobre monosacáridos liberados de salvado de maíz desestabilizado. Los niveles de azúcar se expresan como el área bajo la curva multiplicada por un factor de dilución.

	Gal	Área*factor de dilución	Xyl
Blanco	1		0
GH31	1		0
GH11, 43, 51	9		23
GH11, 43, 51, 31	9		23

Material biológico

20 [0352] En este documento se ha hecho referencia al depósito de libre acceso de la cepa microbiana *Bacteroides ovatus* (ATCC 8483) depositado en la ATCC en 1933 por Eggerth (Eggerth AH, Gagnon BH. The bacteroides of human feces. J. Bacteriol. 25:389-413, 1933).

25 [0353] La invención descrita y reivindicada en este documento no debe verse limitada por los aspectos específicos aquí descritos, ya que estos aspectos pretenden ser ilustraciones de varios aspectos de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento, y varias modificaciones de la invención además de las mostradas y descritas en el presente documento serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. En el caso de conflicto, la presente divulgación, incluidas las definiciones, prevalecerá.

30

LISTADO DE SECUENCIAS

[0354]

35 <110> Novozymes A/S

<120> POLIPÉPTIDOS QUE TIENEN ACTIVIDAD DE ALFA-XILOSIDASA Y POLINUCLEÓTIDOS QUE LOS CODIFICAN

# ES 2 650 115 T3

```

<130> 12569-WO-PCT
<150> EP13178255.9
<151> 2013-07-26
5
<160> 5
<170> versión de PatentIn 3.5
10
<210> 1
<211> 2445
<212> ADN
<213> Bacteroides ovatus
15
<220>
<221> misc_signal
<222> (1)..(63)
20
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2442)
<220>
25
<221> mat_peptide
<222> (64)..(2442)
<400> 1
30
atg aaa ata cat cat cta ttt tgg ggt ata tgt tta tgc ttc agc aca
48
Met Lys Ile His His Leu Phe Trp Gly Ile Cys Leu Cys Phe Ser Thr
-20 -15 -10
35
aat atc tta ttc gca cag aac tat cag aaa aca tcg tcc ggt atc aaa
96
Asn Ile Leu Phe Ala Gln Asn Tyr Gln Lys Thr Ser Ser Gly Ile Lys
-5 -1 1 5 10
40
acc act gta aat gca gtg gat ata gaa gta caa ttc ttt gcg cct gct
144
Thr Thr Val Asn Ala Val Asp Ile Glu Val Gln Phe Phe Ala Pro Ala
15 20 25
45
gtg gcg aga gta ata aag tca ccg gaa ggt gtt gcc tat gaa aaa cag
192
Val Ala Arg Val Ile Lys Ser Pro Glu Gly Val Ala Tyr Glu Lys Gln
30 35 40
50
agt ctt tct gta att gcc aaa cct gaa aag gtg agt ttc aaa gct gat
240
Ser Leu Ser Val Ile Ala Lys Pro Glu Lys Val Ser Phe Lys Ala Asp
45 50 55
55
ata caa gat aat aag att gta ttg aat acc agt gaa cta agt gtc agt
288
Ile Gln Asp Asn Lys Ile Val Leu Asn Thr Ser Glu Leu Ser Val Ser
60 65 70 75

```

ES 2 650 115 T3

gtg gac acc ggg acg gga att gtt tct tat ttc tca aag gat ggc aaa  
336  
Val Asp Thr Gly Thr Gly Ile Val Ser Tyr Phe Ser Lys Asp Gly Lys  
80 85 90

5  
tca tta ttg gca gag aaa tcc ggt atg cag ttt atc gat ttc gat gat  
384  
Ser Leu Leu Ala Glu Lys Ser Gly Met Gln Phe Ile Asp Phe Asp Asp  
95 100 105

10  
gcc ggg aca aaa act tat cag gtt tat caa cct ttt ata tta gat aag  
432  
Ala Gly Thr Lys Thr Tyr Gln Val Tyr Gln Pro Phe Ile Leu Asp Lys  
110 115 120

15  
gag gaa gct att tat ggt ttg gga caa ttg caa aat gga aag atg att  
480  
Glu Glu Ala Ile Tyr Gly Leu Gly Gln Leu Gln Asn Gly Lys Met Ile  
125 130 135

20  
cag cgg aac atg acc aaa aat ctg ata cag gga aat gtt gaa gat gtg  
528  
Gln Arg Asn Met Thr Lys Asn Leu Ile Gln Gly Asn Val Glu Asp Val  
140 145 150 155

25  
tcg cca ttc ttc cag tcc acc aaa gga tat ggt gtg ttt tgg gat aac  
576  
Ser Pro Phe Phe Gln Ser Thr Lys Gly Tyr Gly Val Phe Trp Asp Asn  
160 165 170

30  
tat tcg ccg act ctt ttt acg gac aac gaa gtt gaa aca tct ttt cgt  
624  
Tyr Ser Pro Thr Leu Phe Thr Asp Asn Glu Val Glu Thr Ser Phe Arg  
175 180 185

35  
tct gaa gta ggt gat tgt gta gac tat tat ttc atg tat ggg aag gat  
672  
Ser Glu Val Gly Asp Cys Val Asp Tyr Tyr Phe Met Tyr Gly Lys Asp  
190 195 200

40  
gcc gat ggt gta ata gca caa gta cgc agc ttg acc ggg caa gca ccg  
720  
Ala Asp Gly Val Ile Ala Gln Val Arg Ser Leu Thr Gly Gln Ala Pro  
205 210 215

45  
atg ttt cct tta tgg act tat ggt tac tgg caa agt aaa gaa aga tat  
768  
Met Phe Pro Leu Trp Thr Tyr Gly Tyr Trp Gln Ser Lys Glu Arg Tyr  
220 225 230 235

50  
aaa agc cag gag gaa gtg gta gac gtt gtt cgt aaa tat cgt gaa ttg  
816  
Lys Ser Gln Glu Glu Val Val Asp Val Val Arg Lys Tyr Arg Glu Leu  
240 245 250

55  
ggt att cct ttg gat ggc att att cag gat tgg caa tat tgg ggg cat  
864  
Gly Ile Pro Leu Asp Gly Ile Ile Gln Asp Trp Gln Tyr Trp Gly His  
255 260 265

60

## ES 2 650 115 T3

aac tat ttg tgg aat gcg atg gat ttt cag aat ccg act ttc aat aat  
 912  
 Asn Tyr Leu Trp Asn Ala Met Asp Phe Gln Asn Pro Thr Phe Asn Asn  
           270                                  275                                  280

5

cct caa aag atg atg gag gat gtc cat gcg atg aac gca cac atg gct  
 960  
 Pro Gln Lys Met Met Glu Asp Val His Ala Met Asn Ala His Met Ala  
           285                                  290                                  295

10

ata tct atc tgg tcg tca ttc gga ccg atg acc aaa cct tat aga gaa  
 1008  
 Ile Ser Ile Trp Ser Ser Phe Gly Pro Met Thr Lys Pro Tyr Arg Glu  
 300                                  305                                  310                                  315

15

ttg gac aaa aaa ggt atg ttg ttt aat ttc act acc tgg ccg caa tcg  
 1056  
 Leu Asp Lys Lys Gly Met Leu Phe Asn Phe Thr Thr Trp Pro Gln Ser  
                                   320                                  325                                  330

20

ggg ttg gag tca tgg ccc ccc aat atg gaa tat cct tcc ggt gta aga  
 1104  
 Gly Leu Glu Ser Trp Pro Pro Asn Met Glu Tyr Pro Ser Gly Val Arg  
                                   335                                  340                                  345

25

gtg tat gat gct tac aat ccc gaa gcg cgt gac att tat tgg aaa tat  
 1152  
 Val Tyr Asp Ala Tyr Asn Pro Glu Ala Arg Asp Ile Tyr Trp Lys Tyr  
                                   350                                  355                                  360

30

ctg aat gat gga att ttt aag ttg gga atg gat gcc tgg tgg atg gat  
 1200  
 Leu Asn Asp Gly Ile Phe Lys Leu Gly Met Asp Ala Trp Trp Met Asp  
           365                                  370                                  375

35

tct acc gaa ccc gat cat ttg gat tgg aag ccg gag gat atg gat acc  
 1248  
 Ser Thr Glu Pro Asp His Leu Asp Trp Lys Pro Glu Asp Met Asp Thr  
 380                                  385                                  390                                  395

40

aaa acc tat ctg ggc tcg ttc cgt agg gtg cgc aat gct tat ccg ttg  
 1296  
 Lys Thr Tyr Leu Gly Ser Phe Arg Arg Val Arg Asn Ala Tyr Pro Leu  
                                   400                                  405                                  410

45

atg act gtc gga ggg gtt tac gac cat cag cgt gca gtg act tcg gac  
 1344  
 Met Thr Val Gly Gly Val Tyr Asp His Gln Arg Ala Val Thr Ser Asp  
                                   415                                  420                                  425

50

aaa cgg gtg ttt att tta acc cgt tcg gga ttc ttg ggg cag caa cgt  
 1392  
 Lys Arg Val Phe Ile Leu Thr Arg Ser Gly Phe Leu Gly Gln Gln Arg  
           430                                  435                                  440

55

tat ggt gca aat gta tgg agt ggt gat gtc gct tcc aca tgg gag agt  
 1440  
 Tyr Gly Ala Asn Val Trp Ser Gly Asp Val Ala Ser Thr Trp Glu Ser  
           445                                  450                                  455

60

# ES 2 650 115 T3

ttt aga aat cag att cct gcc gga tta aac ttt tct ttg tgt ggt atg  
 1488  
 Phe Arg Asn Gln Ile Pro Ala Gly Leu Asn Phe Ser Leu Cys Gly Met  
 460 465 470 475

5

cct cac tgg aat agt gat att ggt ggc ttt ttt gca gga cat tat aat  
 1536  
 Pro His Trp Asn Ser Asp Ile Gly Gly Phe Phe Ala Gly His Tyr Asn  
 480 485 490

10

aaa agc tgg aat gat gat agt gct tca aaa aat cca ttg tat cag gag  
 1584  
 Lys Ser Trp Asn Asp Asp Ser Ala Ser Lys Asn Pro Leu Tyr Gln Glu  
 495 500 505

15

ctt tat gtg cgt tgg ttg cag ttt ggg acg ttc aat ccg atg atg cgt  
 1632  
 Leu Tyr Val Arg Trp Leu Gln Phe Gly Thr Phe Asn Pro Met Met Arg  
 510 515 520

20

tcg cac ggg acg gat gtt tat agg gaa atc tat aag ttc gga aag aag  
 1680  
 Ser His Gly Thr Asp Val Tyr Arg Glu Ile Tyr Lys Phe Gly Lys Lys  
 525 530 535

25

ggc gaa cct gta tat gat gct atc gag aag atg ata ggt tta cgt tac  
 1728  
 Gly Glu Pro Val Tyr Asp Ala Ile Glu Lys Met Ile Gly Leu Arg Tyr  
 540 545 550 555

30

tct ctg ttg cct tat att tat tct act tct tgg gag gtg agc aat cgt  
 1776  
 Ser Leu Leu Pro Tyr Ile Tyr Ser Thr Ser Trp Glu Val Ser Asn Arg  
 560 565 570

35

caa tcg agt ttt atg cgc gct ttg atg atg gat ttt gta gat gac aga  
 1824  
 Gln Ser Ser Phe Met Arg Ala Leu Met Met Asp Phe Val Asp Asp Arg  
 575 580 585

40

aag gtg tgg gat atc aat gac gaa tat atg ttt gga aaa tcg atc ctt  
 1872  
 Lys Val Trp Asp Ile Asn Asp Glu Tyr Met Phe Gly Lys Ser Ile Leu  
 590 595 600

45

gtg gct ccg att gct cat gca caa tat aca ccg gaa gct gtg gta aaa  
 1920  
 Val Ala Pro Ile Ala His Ala Gln Tyr Thr Pro Glu Ala Val Val Lys  
 605 610 615

50

gtc tcc gaa gaa gaa gga tgg aac aga gat gga gcg aaa aaa aca aaa  
 1968  
 Val Ser Glu Glu Glu Gly Trp Asn Arg Asp Gly Ala Lys Lys Thr Lys  
 620 625 630 635

55

act gac gct gct gtg gat ttc atg gaa acg aaa tct act aac ata tac  
 2016  
 Thr Asp Ala Ala Val Asp Phe Met Glu Thr Lys Ser Thr Asn Ile Tyr  
 640 645 650

60



# ES 2 650 115 T3

```

    tta ccg gca gga acg cta tgg tat gac ttc tgg acg aac gag aaa cat
    2064
    Leu Pro Ala Gly Thr Leu Trp Tyr Asp Phe Trp Thr Asn Glu Lys His
                655                      660                      665
5
    gaa ggc gga aag gaa att acc aaa gag act aca ctg gat gtt att cca
    2112
    Glu Gly Gly Lys Glu Ile Thr Lys Glu Thr Thr Leu Asp Val Ile Pro
                670                      675                      680
10
    ttg tat gta aaa gcg ggt agt att att cct gtc ggt cca caa gtt cag
    2160
    Leu Tyr Val Lys Ala Gly Ser Ile Ile Pro Val Gly Pro Gln Val Gln
                685                      690                      695
15
    tat gca act gaa aaa ccg tgg gat cat ctt gaa ttg aag gtg tat gcg
    2208
    Tyr Ala Thr Glu Lys Pro Trp Asp His Leu Glu Leu Lys Val Tyr Ala
    700                      705                      710                      715
20
    ggt gcg aat gga aac ttc att tta tat gaa gat gaa ttt gat aat tac
    2256
    Gly Ala Asn Gly Asn Phe Ile Leu Tyr Glu Asp Glu Phe Asp Asn Tyr
                720                      725                      730
25
    aat tat gaa aaa gga gct tat acg gaa att cca atc tct tgg aat aat
    2304
    Asn Tyr Glu Lys Gly Ala Tyr Thr Glu Ile Pro Ile Ser Trp Asn Asn
                735                      740                      745
30
    gca tct cgt aaa ttg acg ata ggg gca aga aaa ggt gcg tat gag gga
    2352
    Ala Ser Arg Lys Leu Thr Ile Gly Ala Arg Lys Gly Ala Tyr Glu Gly
                750                      755                      760
35
    atg ttg aag aac cgt aag ttt act gta act ctt cag gat ggg act caa
    2400
    Met Leu Lys Asn Arg Lys Phe Thr Val Thr Leu Gln Asp Gly Thr Gln
                765                      770                      775
40
    aaa aac atc gat tat aat ggg aaa gcg att tct gta aag ttt tga
    2445
    Lys Asn Ile Asp Tyr Asn Gly Lys Ala Ile Ser Val Lys Phe
    780                      785                      790
45
    <210> 2
    <211> 814
    <212> PRT
50
    <213> Bacteroides ovatus

    <400> 2

    Met Lys Ile His His Leu Phe Trp Gly Ile Cys Leu Cys Phe Ser Thr
    55
        -20                      -15                      -10

    Asn Ile Leu Phe Ala Gln Asn Tyr Gln Lys Thr Ser Ser Gly Ile Lys
    60
        -5                      -1 1                      5                      10

```

# ES 2 650 115 T3

	Thr	Thr	Val	Asn	Ala	Val	Asp	Ile	Glu	Val	Gln	Phe	Phe	Ala	Pro	Ala
				15					20					25		
5	Val	Ala	Arg	Val	Ile	Lys	Ser	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Tyr	Glu	Lys	Gln
			30					35					40			
10	Ser	Leu	Ser	Val	Ile	Ala	Lys	Pro	Glu	Lys	Val	Ser	Phe	Lys	Ala	Asp
	45						50					55				
15	Ile	Gln	Asp	Asn	Lys	Ile	Val	Leu	Asn	Thr	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Ser
	60				65					70					75	
20	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Tyr	Phe	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys
				80						85					90	
25	Ser	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ser	Gly	Met	Gln	Phe	Ile	Asp	Phe	Asp	Asp
				95					100					105		
30	Ala	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Gln	Pro	Phe	Ile	Leu	Asp	Lys
			110					115					120			
35	Glu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Asn	Gly	Lys	Met	Ile
	125						130					135				
40	Gln	Arg	Asn	Met	Thr	Lys	Asn	Leu	Ile	Gln	Gly	Asn	Val	Glu	Asp	Val
	140					145					150				155	
45	Ser	Pro	Phe	Phe	Gln	Ser	Thr	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Phe	Trp	Asp	Asn
					160					165					170	
50	Tyr	Ser	Pro	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Asn	Glu	Val	Glu	Thr	Ser	Phe	Arg
				175					180					185		
55	Ser	Glu	Val	Gly	Asp	Cys	Val	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Met	Tyr	Gly	Lys	Asp
			190					195					200			
60	Ala	Asp	Gly	Val	Ile	Ala	Gln	Val	Arg	Ser	Leu	Thr	Gly	Gln	Ala	Pro
	205						210					215				
65	Met	Phe	Pro	Leu	Trp	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gln	Ser	Lys	Glu	Arg	Tyr
	220					225					230				235	
70	Lys	Ser	Gln	Glu	Glu	Val	Val	Asp	Val	Val	Arg	Lys	Tyr	Arg	Glu	Leu
				240						245					250	

# ES 2 650 115 T3

	Gly	Ile	Pro	Leu	Asp	Gly	Ile	Ile	Gln	Asp	Trp	Gln	Tyr	Trp	Gly	His
				255					260					265		
5	Asn	Tyr	Leu	Trp	Asn	Ala	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	Pro	Thr	Phe	Asn	Asn
			270					275					280			
10	Pro	Gln	Lys	Met	Met	Glu	Asp	Val	His	Ala	Met	Asn	Ala	His	Met	Ala
		285					290					295				
15	Ile	Ser	Ile	Trp	Ser	Ser	Phe	Gly	Pro	Met	Thr	Lys	Pro	Tyr	Arg	Glu
	300					305					310					315
20	Leu	Asp	Lys	Lys	Gly	Met	Leu	Phe	Asn	Phe	Thr	Thr	Trp	Pro	Gln	Ser
				320						325					330	
25	Gly	Leu	Glu	Ser	Trp	Pro	Pro	Asn	Met	Glu	Tyr	Pro	Ser	Gly	Val	Arg
				335					340					345		
30	Val	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Asn	Pro	Glu	Ala	Arg	Asp	Ile	Tyr	Trp	Lys	Tyr
			350					355					360			
35	Leu	Asn	Asp	Gly	Ile	Phe	Lys	Leu	Gly	Met	Asp	Ala	Trp	Trp	Met	Asp
		365					370					375				
40	Ser	Thr	Glu	Pro	Asp	His	Leu	Asp	Trp	Lys	Pro	Glu	Asp	Met	Asp	Thr
	380					385					390					395
45	Lys	Thr	Tyr	Leu	Gly	Ser	Phe	Arg	Arg	Val	Arg	Asn	Ala	Tyr	Pro	Leu
				400						405					410	
50	Met	Thr	Val	Gly	Gly	Val	Tyr	Asp	His	Gln	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Asp
				415					420					425		
55	Lys	Arg	Val	Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Gln	Gln	Arg
			430					435					440			
60	Tyr	Gly	Ala	Asn	Val	Trp	Ser	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Thr	Trp	Glu	Ser
		445					450					455				
65	Phe	Arg	Asn	Gln	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Asn	Phe	Ser	Leu	Cys	Gly	Met
	460					465					470					475
70	Pro	His	Trp	Asn	Ser	Asp	Ile	Gly	Gly	Phe	Phe	Ala	Gly	His	Tyr	Asn
				480						485					490	

# ES 2 650 115 T3

	Lys	Ser	Trp	Asn	Asp	Asp	Ser	Ala	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Tyr	Gln	Glu
				495					500					505		
5	Leu	Tyr	Val	Arg	Trp	Leu	Gln	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Pro	Met	Met	Arg
			510					515					520			
10	Ser	His	Gly	Thr	Asp	Val	Tyr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gly	Lys	Lys
		525					530					535				
15	Gly	Glu	Pro	Val	Tyr	Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Met	Ile	Gly	Leu	Arg	Tyr
	540					545					550					555
20	Ser	Leu	Leu	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Arg
					560					565					570	
25	Gln	Ser	Ser	Phe	Met	Arg	Ala	Leu	Met	Met	Asp	Phe	Val	Asp	Asp	Arg
				575					580					585		
30	Lys	Val	Trp	Asp	Ile	Asn	Asp	Glu	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Ser	Ile	Leu
			590					595					600			
35	Val	Ala	Pro	Ile	Ala	His	Ala	Gln	Tyr	Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Val	Lys
		605					610					615				
40	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Trp	Asn	Arg	Asp	Gly	Ala	Lys	Lys	Thr	Lys
	620					625					630					635
45	Thr	Asp	Ala	Ala	Val	Asp	Phe	Met	Glu	Thr	Lys	Ser	Thr	Asn	Ile	Tyr
					640					645					650	
50	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Trp	Tyr	Asp	Phe	Trp	Thr	Asn	Glu	Lys	His
				655					660					665		
55	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu	Ile	Thr	Lys	Glu	Thr	Thr	Leu	Asp	Val	Ile	Pro
			670					675					680			
60	Leu	Tyr	Val	Lys	Ala	Gly	Ser	Ile	Ile	Pro	Val	Gly	Pro	Gln	Val	Gln
		685					690					695				
65	Tyr	Ala	Thr	Glu	Lys	Pro	Trp	Asp	His	Leu	Glu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ala
	700					705					710					715
60	Gly	Ala	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Phe	Asp	Asn	Tyr
					720					725					730	

# ES 2 650 115 T3

```

Asn Tyr Glu Lys Gly Ala Tyr Thr Glu Ile Pro Ile Ser Trp Asn Asn
      735                      740                      745

5
Ala Ser Arg Lys Leu Thr Ile Gly Ala Arg Lys Gly Ala Tyr Glu Gly
      750                      755                      760

10
Met Leu Lys Asn Arg Lys Phe Thr Val Thr Leu Gln Asp Gly Thr Gln
      765                      770                      775

15
Lys Asn Ile Asp Tyr Asn Gly Lys Ala Ile Ser Val Lys Phe
      780                      785                      790

<210> 3
<211> 793
20 <212> PRT
    <213> Bacteroides ovatus

<220>
25 <221> mat_peptide
    <222> (1)..(793)

<400> 3

30 Gln Asn Tyr Gln Lys Thr Ser Ser Gly Ile Lys Thr Thr Val Asn Ala
    1          5          10          15

35 Val Asp Ile Glu Val Gln Phe Phe Ala Pro Ala Val Ala Arg Val Ile
    20          25          30

40 Lys Ser Pro Glu Gly Val Ala Tyr Glu Lys Gln Ser Leu Ser Val Ile
    35          40          45

Ala Lys Pro Glu Lys Val Ser Phe Lys Ala Asp Ile Gln Asp Asn Lys
    50          55          60

45 Ile Val Leu Asn Thr Ser Glu Leu Ser Val Ser Val Asp Thr Gly Thr
    65          70          75          80

50 Gly Ile Val Ser Tyr Phe Ser Lys Asp Gly Lys Ser Leu Leu Ala Glu
    85          90          95

Lys Ser Gly Met Gln Phe Ile Asp Phe Asp Asp Ala Gly Thr Lys Thr
55      100          105          110

Tyr Gln Val Tyr Gln Pro Phe Ile Leu Asp Lys Glu Glu Ala Ile Tyr
60      115          120          125

```

# ES 2 650 115 T3

	Gly	Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Asn	Gly	Lys	Met	Ile	Gln	Arg	Asn	Met	Thr
	130						135					140				
5	Lys	Asn	Leu	Ile	Gln	Gly	Asn	Val	Glu	Asp	Val	Ser	Pro	Phe	Phe	Gln
	145					150					155					160
10	Ser	Thr	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Phe	Trp	Asp	Asn	Tyr	Ser	Pro	Thr	Leu
					165					170					175	
15	Phe	Thr	Asp	Asn	Glu	Val	Glu	Thr	Ser	Phe	Arg	Ser	Glu	Val	Gly	Asp
				180					185					190		
20	Cys	Val	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Met	Tyr	Gly	Lys	Asp	Ala	Asp	Gly	Val	Ile
			195					200					205			
25	Ala	Gln	Val	Arg	Ser	Leu	Thr	Gly	Gln	Ala	Pro	Met	Phe	Pro	Leu	Trp
	210						215					220				
30	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gln	Ser	Lys	Glu	Arg	Tyr	Lys	Ser	Gln	Glu	Glu
	225					230					235					240
35	Val	Val	Asp	Val	Val	Arg	Lys	Tyr	Arg	Glu	Leu	Gly	Ile	Pro	Leu	Asp
					245					250					255	
40	Gly	Ile	Ile	Gln	Asp	Trp	Gln	Tyr	Trp	Gly	His	Asn	Tyr	Leu	Trp	Asn
				260					265					270		
45	Ala	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	Pro	Thr	Phe	Asn	Asn	Pro	Gln	Lys	Met	Met
			275					280					285			
50	Glu	Asp	Val	His	Ala	Met	Asn	Ala	His	Met	Ala	Ile	Ser	Ile	Trp	Ser
	290						295					300				
55	Ser	Phe	Gly	Pro	Met	Thr	Lys	Pro	Tyr	Arg	Glu	Leu	Asp	Lys	Lys	Gly
	305					310					315					320
60	Met	Leu	Phe	Asn	Phe	Thr	Thr	Trp	Pro	Gln	Ser	Gly	Leu	Glu	Ser	Trp
				325						330					335	
65	Pro	Pro	Asn	Met	Glu	Tyr	Pro	Ser	Gly	Val	Arg	Val	Tyr	Asp	Ala	Tyr
				340					345					350		
70	Asn	Pro	Glu	Ala	Arg	Asp	Ile	Tyr	Trp	Lys	Tyr	Leu	Asn	Asp	Gly	Ile
			355					360					365			

# ES 2 650 115 T3

	Phe	Lys	Leu	Gly	Met	Asp	Ala	Trp	Trp	Met	Asp	Ser	Thr	Glu	Pro	Asp
		370					375					380				
5	His	Leu	Asp	Trp	Lys	Pro	Glu	Asp	Met	Asp	Thr	Lys	Thr	Tyr	Leu	Gly
	385					390					395					400
10	Ser	Phe	Arg	Arg	Val	Arg	Asn	Ala	Tyr	Pro	Leu	Met	Thr	Val	Gly	Gly
					405					410					415	
15	Val	Tyr	Asp	His	Gln	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Asp	Lys	Arg	Val	Phe	Ile
				420					425					430		
20	Leu	Thr	Arg	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Gln	Gln	Arg	Tyr	Gly	Ala	Asn	Val
			435					440					445			
25	Trp	Ser	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Thr	Trp	Glu	Ser	Phe	Arg	Asn	Gln	Ile
	450						455					460				
30	Pro	Ala	Gly	Leu	Asn	Phe	Ser	Leu	Cys	Gly	Met	Pro	His	Trp	Asn	Ser
	465					470					475					480
35	Asp	Ile	Gly	Gly	Phe	Phe	Ala	Gly	His	Tyr	Asn	Lys	Ser	Trp	Asn	Asp
					485					490					495	
40	Asp	Ser	Ala	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Tyr	Gln	Glu	Leu	Tyr	Val	Arg	Trp
				500					505					510		
45	Leu	Gln	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Pro	Met	Met	Arg	Ser	His	Gly	Thr	Asp
			515					520					525			
50	Val	Tyr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gly	Lys	Lys	Gly	Glu	Pro	Val	Tyr
	530						535					540				
55	Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Met	Ile	Gly	Leu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu	Pro	Tyr
	545					550					555					560
60	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Arg	Gln	Ser	Ser	Phe	Met
					565					570					575	
65	Arg	Ala	Leu	Met	Met	Asp	Phe	Val	Asp	Asp	Arg	Lys	Val	Trp	Asp	Ile
				580					585					590		
70	Asn	Asp	Glu	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Ser	Ile	Leu	Val	Ala	Pro	Ile	Ala
			595					600					605			

# ES 2 650 115 T3

	His	Ala	Gln	Tyr	Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Val	Lys	Val	Ser	Glu	Glu	Glu
	610						615					620				
5	Gly	Trp	Asn	Arg	Asp	Gly	Ala	Lys	Lys	Thr	Lys	Thr	Asp	Ala	Ala	Val
	625					630					635					640
10	Asp	Phe	Met	Glu	Thr	Lys	Ser	Thr	Asn	Ile	Tyr	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr
					645					650					655	
15	Leu	Trp	Tyr	Asp	Phe	Trp	Thr	Asn	Glu	Lys	His	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu
				660					665					670		
20	Ile	Thr	Lys	Glu	Thr	Thr	Leu	Asp	Val	Ile	Pro	Leu	Tyr	Val	Lys	Ala
			675					680						685		
25	Gly	Ser	Ile	Ile	Pro	Val	Gly	Pro	Gln	Val	Gln	Tyr	Ala	Thr	Glu	Lys
		690					695					700				
30	Pro	Trp	Asp	His	Leu	Glu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ala	Gly	Ala	Asn	Gly	Asn
	705					710					715					720
35	Phe	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Phe	Asp	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Glu	Lys	Gly
					725					730					735	
40	Ala	Tyr	Thr	Glu	Ile	Pro	Ile	Ser	Trp	Asn	Asn	Ala	Ser	Arg	Lys	Leu
				740					745					750		
45	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Lys	Gly	Ala	Tyr	Glu	Gly	Met	Leu	Lys	Asn	Arg
			755					760					765			
50	Lys	Phe	Thr	Val	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Thr	Gln	Lys	Asn	Ile	Asp	Tyr
		770					775					780				
55	Asn	Gly	Lys	Ala	Ile	Ser	Val	Lys	Phe							
	785					790										
60	<210>	4														
	<211>	814														
	<212>	PRT														
	<213>	Bacteroides	CL													
	<220>															
	<221>	SEÑAL														
	<222>	(-21)..(-1)														
	<220>															



# ES 2 650 115 T3

<221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(793)

<400> 4

5  
 Met Lys Ile His His Leu Phe Trp Gly Ile Cys Leu Cys Phe Ser Thr  
 -20 -15 -10

10  
 Asn Ile Leu Phe Ala Gln Asn Tyr Gln Lys Thr Ser Ser Gly Ile Lys  
 -5 -1 1 5 10

15  
 Thr Thr Val Asn Ala Val Asp Ile Glu Val Gln Phe Phe Ala Pro Ala  
 15 20 25

20  
 Val Ala Arg Val Ile Lys Ser Pro Glu Gly Val Ala Tyr Glu Lys Gln  
 30 35 40

25  
 Ser Leu Ser Val Ile Ala Lys Pro Glu Lys Val Ser Phe Lys Ala Asp  
 45 50 55

30  
 Ile Gln Asp Asn Lys Ile Val Leu Asn Thr Ser Glu Leu Ser Val Ser  
 60 65 70 75

35  
 Val Asp Thr Gly Thr Gly Ile Val Ser Tyr Phe Ser Lys Asp Gly Lys  
 80 85 90

40  
 Ser Leu Leu Ala Glu Lys Ser Gly Met Gln Phe Ile Asp Phe Asp Asp  
 95 100 105

45  
 Ala Gly Thr Lys Thr Tyr Gln Val Tyr Gln Pro Phe Ile Leu Asp Lys  
 110 115 120

50  
 Glu Glu Ala Ile Tyr Gly Leu Gly Gln Leu Gln Asn Gly Lys Met Ile  
 125 130 135

55  
 Gln Arg Asn Met Thr Lys Asn Leu Ile Gln Gly Asn Val Glu Asp Val  
 140 145 150 155

60  
 Ser Pro Phe Phe Gln Ser Thr Lys Gly Tyr Gly Val Phe Trp Asp Asn  
 160 165 170

65  
 Tyr Ser Pro Thr Leu Phe Thr Asp Asn Glu Val Glu Thr Ser Phe Arg  
 175 180 185

70  
 Ser Glu Val Gly Asp Cys Val Asp Tyr Tyr Phe Met Tyr Gly Lys Asp  
 190 195 200

ES 2 650 115 T3

Ala Asp Gly Val Ile Ala Gln Val Arg Ser Leu Thr Gly Gln Ala Pro  
 205 210 215

5

Met Phe Pro Leu Trp Thr Tyr Gly Tyr Trp Gln Ser Lys Glu Arg Tyr  
 220 225 230 235

10

Lys Ser Gln Glu Glu Val Val Asp Val Val Arg Lys Tyr Arg Glu Leu  
 240 245

15

Gly Ile Pro Leu Asp Gly Ile Ile Gln Asp Trp Gln Tyr Trp Gly His  
 255 260 265

20

Asn Tyr Leu Trp Asn Ala Met Asp Phe Gln Asn Pro Thr Phe Asn Asn  
 270 275 280

25

Pro Gln Lys Met Met Glu Asp Val His Ala Met Asn Ala His Met Ala  
 285 290 295

30

Ile Ser Ile Trp Ser Ser Phe Gly Pro Met Thr Lys Pro Tyr Arg Glu  
 300 305 310 315

35

Leu Asp Lys Lys Gly Met Leu Phe Asn Phe Thr Thr Trp Pro Gln Ser  
 320 325 330

40

Gly Leu Glu Ser Trp Pro Pro Asn Met Glu Tyr Pro Ser Gly Val Arg  
 335 340 345

45

Val Tyr Asp Ala Tyr Asn Pro Glu Ala Arg Asp Ile Tyr Trp Lys Tyr  
 350 355 360

50

Leu Asn Asp Gly Ile Phe Lys Leu Gly Met Asp Ala Trp Trp Met Asp  
 365 370 375

55

Ser Thr Glu Pro Asp His Leu Asp Trp Lys Pro Glu Asp Met Asp Thr  
 380 385 390 395

60

Lys Thr Tyr Leu Gly Ser Phe Arg Lys Val Arg Asn Ala Tyr Pro Leu  
 400 405 410

Met Thr Val Gly Gly Val Tyr Asp His Gln Arg Ala Val Thr Ser Asp  
 415 420 425

Lys Arg Val Phe Ile Leu Thr Arg Ser Gly Phe Leu Gly Gln Gln Arg  
 430 435 440

# ES 2 650 115 T3

	Tyr	Gly	Ala	Asn	Val	Trp	Ser	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Thr	Trp	Glu	Ser
	445						450					455				
5	Phe	Arg	Asn	Gln	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Asn	Phe	Ser	Leu	Cys	Gly	Met
	460					465					470					475
10	Pro	His	Trp	Asn	Ser	Asp	Ile	Gly	Gly	Phe	Phe	Ala	Gly	His	Tyr	Asn
				480						485					490	
15	Lys	Ser	Trp	Asn	Asp	Asp	Ser	Ala	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Tyr	Gln	Glu
				495					500					505		
20	Leu	Tyr	Val	Arg	Trp	Leu	Gln	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Pro	Met	Met	Arg
			510					515					520			
25	Ser	His	Gly	Thr	Asp	Val	Tyr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gly	Lys	Lys
		525					530					535				
30	Gly	Glu	Pro	Val	Tyr	Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Met	Ile	Gly	Leu	Arg	Tyr
	540					545					550					555
35	Ser	Leu	Leu	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Arg
					560						565				570	
40	Gln	Ser	Ser	Phe	Met	Arg	Ala	Leu	Met	Met	Asp	Phe	Val	Asp	Asp	Arg
				575					580					585		
45	Lys	Val	Trp	Asp	Ile	Asn	Asp	Glu	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Ser	Ile	Leu
			590					595					600			
50	Val	Ala	Pro	Ile	Thr	His	Ala	Gln	Tyr	Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Val	Lys
		605					610					615				
55	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Trp	Asn	Arg	Asp	Gly	Ala	Lys	Lys	Thr	Lys
	620					625					630					635
60	Thr	Asp	Val	Ala	Val	Asp	Phe	Met	Glu	Thr	Lys	Ser	Thr	Asn	Ile	Tyr
					640					645					650	
65	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Trp	Tyr	Asp	Phe	Trp	Thr	Asn	Glu	Lys	His
				655					660					665		
70	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu	Ile	Thr	Lys	Glu	Thr	Thr	Leu	Asp	Val	Ile	Pro
			670					675					680			

ES 2 650 115 T3

Leu Tyr Val Lys Ala Gly Ser Ile Ile Pro Val Gly Pro Gln Val Gln  
 685 690 695

5

Tyr Ala Thr Glu Lys Pro Trp Asp His Leu Glu Leu Lys Val Tyr Ala  
 700 705 710 715

10

Gly Ala Asn Gly Asn Phe Ile Leu Tyr Glu Asp Glu Phe Asp Asn Tyr  
 720 725 730 735

15

Asn Tyr Glu Lys Gly Val Tyr Thr Glu Ile Pro Ile Ser Trp Asn Asn  
 735 740 745

20

Thr Ser Arg Lys Leu Thr Ile Gly Ala Arg Lys Gly Ala Tyr Glu Gly  
 750 755 760

25

Met Leu Lys Asn Arg Lys Phe Thr Val Thr Leu Gln Asp Gly Thr Gln  
 765 770 775

30

Lys Asn Val Asp Tyr Asn Gly Lys Ala Ile Ser Val Lys Phe  
 780 785 790

35

<210> 5  
 <211> 814  
 <212> PRT  
 <213> Bacteroides sp. D22

40

<220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (-21)..(-1)

45

Met Lys Ile His His Leu Phe Trp Gly Ile Cys Leu Cys Phe Ser Thr  
 -20 -15 -10

50

Asn Val Leu Phe Ala Gln Asn Tyr Gln Lys Thr Ser Ser Gly Ile Lys  
 -5 -1 1 5 10

55

Thr Thr Val Asn Ala Val Asp Ile Glu Val Gln Phe Phe Ala Pro Ala  
 15 20 25

60

Val Ala Arg Ile Ile Lys Ser Pro Glu Gly Val Ala Tyr Glu Lys Glu  
 30 35 40

# ES 2 650 115 T3

	Ser	Leu	Ser	Val	Ile	Ala	Lys	Pro	Glu	Lys	Val	Ser	Phe	Lys	Ala	Asp
	45						50					55				
5	Ile	Lys	Asp	Asn	Lys	Ile	Val	Leu	Asn	Thr	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Ser
	60				65					70						75
10	Val	Asp	Thr	Gly	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Tyr	Phe	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys
					80					85					90	
15	Ser	Leu	Leu	Ala	Glu	Lys	Ser	Gly	Met	Gln	Phe	Ile	Asp	Phe	Asp	Asp
				95					100					105		
20	Ala	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Gln	Val	Tyr	Gln	Pro	Phe	Ile	Leu	Asp	Lys
			110					115					120			
25	Glu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Gly	Leu	Gly	Gln	Leu	Gln	Asn	Gly	Lys	Met	Ile
		125					130					135				
30	Gln	Arg	Asn	Met	Thr	Lys	Asn	Leu	Ile	Gln	Gly	Asn	Val	Glu	Asp	Val
	140					145					150					155
35	Ser	Pro	Phe	Phe	Gln	Ser	Thr	Lys	Gly	Tyr	Gly	Val	Phe	Trp	Asp	Asn
					160					165					170	
40	Tyr	Ser	Pro	Thr	Leu	Phe	Thr	Asp	Asn	Glu	Val	Glu	Thr	Ser	Phe	Arg
				175					180					185		
45	Ser	Glu	Val	Gly	Asp	Cys	Val	Asp	Tyr	Tyr	Phe	Met	Tyr	Gly	Lys	Asp
			190					195					200			
50	Ala	Asp	Gly	Val	Ile	Ala	Gln	Val	Arg	Ser	Leu	Thr	Gly	Gln	Ala	Pro
		205					210					215				
55	Met	Phe	Pro	Leu	Trp	Thr	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Gln	Ser	Lys	Glu	Arg	Tyr
	220					225					230					235
60	Lys	Ser	Gln	Glu	Glu	Val	Val	Asp	Val	Val	Arg	Lys	Tyr	Arg	Glu	Leu
					240					245					250	
65	Gly	Ile	Pro	Leu	Asp	Gly	Ile	Ile	Gln	Asp	Trp	Gln	Tyr	Trp	Gly	His
				255					260					265		
70	Asn	Tyr	Leu	Trp	Asn	Ala	Met	Asp	Phe	Gln	Asn	Pro	Thr	Phe	Asn	Asn
			270					275					280			

# ES 2 650 115 T3

	Pro	Gln	Lys	Met	Ile	Glu	Asp	Val	His	Ala	Met	Asn	Ala	His	Met	Ala
	285						290					295				
5	Ile	Ser	Ile	Trp	Ser	Ser	Phe	Gly	Pro	Met	Thr	Lys	Pro	Tyr	Arg	Glu
	300					305					310					315
10	Leu	Asp	Lys	Lys	Gly	Met	Leu	Phe	Asn	Phe	Thr	Thr	Trp	Pro	Gln	Ser
					320					325					330	
15	Gly	Leu	Glu	Ser	Trp	Pro	Pro	Asn	Met	Glu	Tyr	Pro	Ser	Gly	Val	Arg
				335					340					345		
20	Val	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Asn	Pro	Glu	Ala	Arg	Asp	Ile	Tyr	Trp	Lys	Tyr
			350					355					360			
25	Leu	Asn	Gly	Gly	Ile	Phe	Lys	Leu	Gly	Met	Asp	Ala	Trp	Trp	Met	Asp
		365					370					375				
30	Ser	Thr	Glu	Pro	Asp	His	Leu	Asp	Trp	Lys	Pro	Glu	Asp	Met	Asp	Thr
	380					385					390					395
35	Lys	Thr	Tyr	Leu	Gly	Ser	Phe	Arg	Lys	Val	Arg	Asn	Ala	Tyr	Pro	Leu
					400					405					410	
40	Met	Thr	Val	Gly	Gly	Val	Tyr	Asp	His	Gln	Arg	Glu	Val	Thr	Ser	Asp
				415					420					425		
45	Lys	Arg	Val	Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	Ser	Gly	Phe	Leu	Gly	Gln	Gln	Arg
			430					435					440			
50	Tyr	Gly	Ala	Asn	Val	Trp	Ser	Gly	Asp	Val	Ala	Ser	Thr	Trp	Glu	Ser
	445						450					455				
55	Phe	Arg	Asn	Gln	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Asn	Phe	Ser	Leu	Cys	Gly	Met
	460					465					470					475
60	Pro	His	Trp	Asn	Ser	Asp	Ile	Gly	Gly	Phe	Phe	Ala	Gly	His	Tyr	Asn
				480						485					490	
65	Lys	Ser	Trp	Asn	Asp	Asp	Ser	Ala	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Tyr	Gln	Glu
				495					500					505		
70	Leu	Tyr	Val	Arg	Trp	Leu	Gln	Phe	Gly	Thr	Phe	Asn	Pro	Met	Met	Arg
			510					515					520			

# ES 2 650 115 T3

	Ser	His	Gly	Thr	Asp	Val	Tyr	Arg	Glu	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gly	Lys	Lys
	525						530					535				
5	Gly	Glu	Pro	Val	Tyr	Asp	Ala	Ile	Glu	Lys	Met	Ile	Gly	Leu	Arg	Tyr
	540					545					550					555
10	Ser	Leu	Leu	Pro	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Thr	Ser	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Arg
					560						565					570
15	Gln	Ser	Ser	Phe	Met	Arg	Ala	Leu	Met	Met	Asp	Phe	Val	Asp	Asp	Arg
				575					580					585		
20	Lys	Val	Trp	Asp	Ile	Asn	Asp	Glu	Tyr	Met	Phe	Gly	Lys	Ser	Ile	Leu
			590					595					600			
25	Val	Ala	Pro	Ile	Ala	His	Ala	Gln	Tyr	Thr	Pro	Glu	Ala	Val	Val	Lys
		605					610						615			
30	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Gly	Trp	Asn	Arg	Asp	Gly	Ala	Lys	Lys	Thr	Lys
	620					625					630					635
35	Thr	Asp	Ala	Ala	Val	Asp	Phe	Met	Glu	Thr	Lys	Ser	Thr	Asn	Ile	Tyr
					640						645					650
40	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Trp	Tyr	Asp	Phe	Trp	Thr	Asn	Glu	Lys	His
				655					660					665		
45	Glu	Gly	Gly	Lys	Glu	Ile	Thr	Lys	Glu	Thr	Thr	Leu	Asp	Val	Ile	Pro
			670					675					680			
50	Leu	Tyr	Val	Lys	Ala	Gly	Ser	Ile	Ile	Pro	Val	Gly	Pro	Gln	Val	Gln
		685					690					695				
55	Tyr	Ala	Thr	Glu	Lys	Pro	Trp	Asp	His	Leu	Glu	Leu	Lys	Val	Tyr	Ala
	700					705					710					715
60	Gly	Ala	Asn	Gly	Asn	Phe	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asp	Glu	Phe	Asp	Asn	Tyr
					720					725					730	
65	Asn	Tyr	Glu	Lys	Gly	Ala	Tyr	Thr	Glu	Ile	Pro	Ile	Ser	Trp	Asn	Asn
				735					740					745		
70	Ala	Ser	Arg	Lys	Leu	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Lys	Gly	Ala	Tyr	Glu	Gly
			750					755					760			

# ES 2 650 115 T3

Met Leu Lys Asn Arg Lys Phe Thr Val Thr Leu Gln Asp Gly Thr Gln  
765 770 775

5

Lys Asn Val Asp Tyr Asn Gly Lys Ala Ile Ser Val Lys Phe  
780 785 790



## REIVINDICACIONES

1. Uso de un polipéptido aislado que tiene actividad de alfa-xilosidasa, seleccionado del grupo consistente en:

- 5 (a) un polipéptido con al menos 80% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2;  
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibridiza bajo condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i);  
 10 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 80% de identidad de secuencia respecto a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1;  
 (d) una variante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 que comprende una sustitución, delección, y/o inserción en una o más posiciones, donde los polipéptidos difieren en no más de treinta aminoácidos; y  
 15 (e) un fragmento del polipéptido de (a); (b), (c), o (d) que tiene actividad de alfa-xilosidasa, donde el fragmento contiene al menos 90% de los aminoácidos del péptido maduro,

en pienso para animales y composiciones de pienso para animales.

20 2. Uso de la reivindicación 1, donde el polipéptido comprende o consiste en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 5, el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 4 o el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 5.

3. Uso de la reivindicación 2, donde el polipéptido maduro es los aminoácidos 1 a 793 de la SEQ ID NO: 2, los aminoácidos 1 a 793 de la SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos 1 a 793 de la SEQ ID NO: 5.

25 4. Composición que comprende un polipéptido aislado que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa, seleccionado del grupo que consiste en:

- 30 (a) un polipéptido que tiene al menos 80%, por ejemplo al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3;  
 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con:

- 35 (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; y/o  
 (ii) la cadena complementaria de longitud completa de (i);

- 40 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene al menos 80%, por ejemplo, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91 %, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 3;  
 (d) una variante que comprende una sustitución, delección y/o inserción de uno o más (varios) aminoácidos del péptido maduro de la SEQ ID NO: 3, donde los polipéptidos difieren en no más de treinta aminoácidos; y  
 45 (e) un fragmento de un polipéptido de (a), (b), (c) o (d), que tiene actividad de  $\alpha$ -xilosidasa, donde el fragmento contiene al menos 90% de los aminoácidos del péptido maduro.

5. Composición de la reivindicación 4, donde el polipéptido comprende o consiste en el péptido maduro de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 5.

50 6. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, que está en forma de un granulado o un microgranulado.

7. Formulación de caldo completo o composición de cultivo celular que comprende un polipéptido indicado en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

8. Uso de al menos un polipéptido indicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en pienso para animales;  
 en aditivos para pienso para animales;  
 60 en la preparación de una composición para uso en pienso para animales;  
 para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales;  
 para aumentar la proteína digerible y/o soluble en pienso para animales;  
 para aumentar el grado de hidrólisis de las proteínas en las dietas para animales; y/o  
 para el tratamiento de proteínas.

65 9. Método para mejorar el valor nutricional de un pienso para animales, donde al menos un polipéptido indicado

en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 se añade al pienso.

- 5 10. Aditivo para pienso que comprende  
al menos un polipéptido indicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y  
al menos una vitamina soluble en grasa, y/o  
al menos una vitamina soluble en agua, y/o  
al menos un oligoelemento.
- 10 11. Aditivo para pienso para animales de la reivindicación 10, donde el pienso para animales comprende una o  
más enzimas adicionales, donde las enzimas adicionales se seleccionan del grupo que comprende amilasas;  
fitasas; xilanasas; galactanasas; alfa-galactosidasas; proteasas, fosfolipasas; y beta-glucanasas, o cualquier  
mezcla de las mismas.
- 15 12. Aditivo para pienso para animales de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11 que comprende al menos un  
microbiano probiótico o de alimentación directa (DFM).
- 20 13. Pienso para animales que tiene un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg y que comprende al menos  
un polipéptido indicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 14. Método para el tratamiento de proteínas, que comprende el paso de añadir al menos un polipéptido indicado  
en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a al menos una proteína o fuente de proteína.
15. Método de la reivindicación 14, donde se incluye grano, maíz, soja o harina de soja en la al menos una fuente  
de proteína.

	10	20	30	40	50
<b>YicI</b>	..... .....	..... .....	..... *.....	..... .....	..... .....
	PGLAIYDFTN	PDACKWYADK	LKGLVA~MGV	DCFKTD <del>D</del> FGER	IPTDVQWFDG
<b>BoXyl31A</b>	SGVRVYDAYN	PEARDIYWKY	LNDGIFKLG	DAWWM <del>D</del> STEP	DHLD~~~~~G
	60	70	80	90	100
<b>YicI</b>	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	DPQKMHNHYA	YIYNELVWNV	LKDTVGE <del>E</del> E	VL <del>F</del> FARSASVG	AQKF~PVHWG
<b>BoXyl31A</b>	SFRRVRNAYP	LMTVGGVYDH	QRAVTS <del>D</del> KRV	FILTRSGFLG	QORYGANVWS
	110	120	130	140	150
<b>YicI</b>	.*..... .....	..... .....	..... .....	..... .....	..... .....
	GDCYANYESM	AESLRGGLSI	GLSGFGFW <del>S</del> H	DIGGFENYLY	REAA <del>R</del> ANARG
<b>BoXyl31A</b>	GDVASTWESF	RNQIPAGLNF	SLCGMPH <del>W</del> NS	DIGGFFAYIY	STSWEVSNRQ
	160	170			
<b>YicI</b>	..... .....	..... .....	..... .....		
	TPMMRAMMME	FPDDPACDYL	DRQYMLGD~		
<b>BoXyl31A</b>	SSFMRALMMD	FVDDRK <del>V</del> WDI	NDEYMF <del>G</del> KS		

Fig. 1

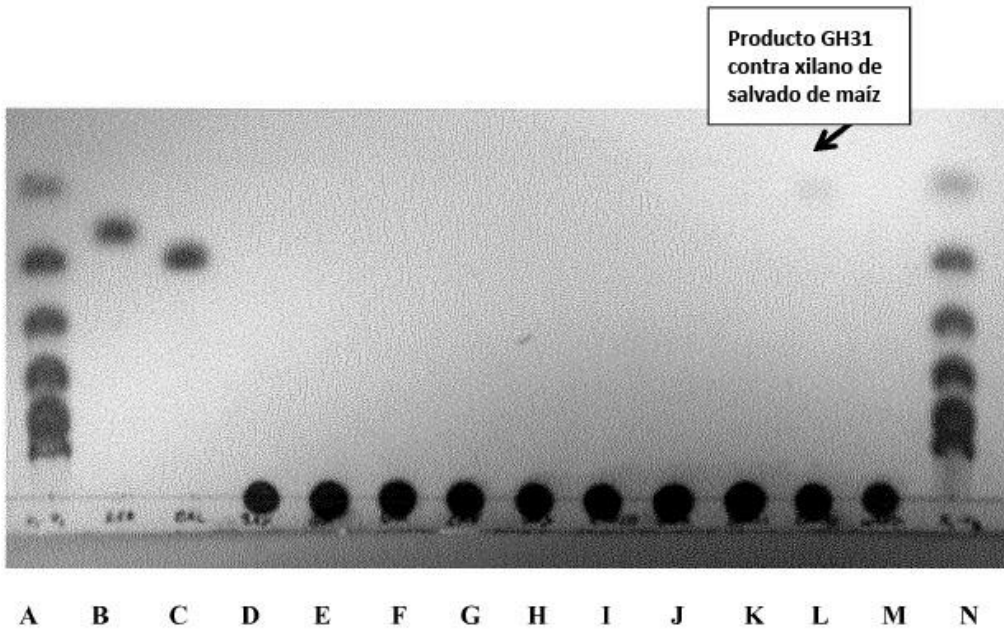


Fig. 2

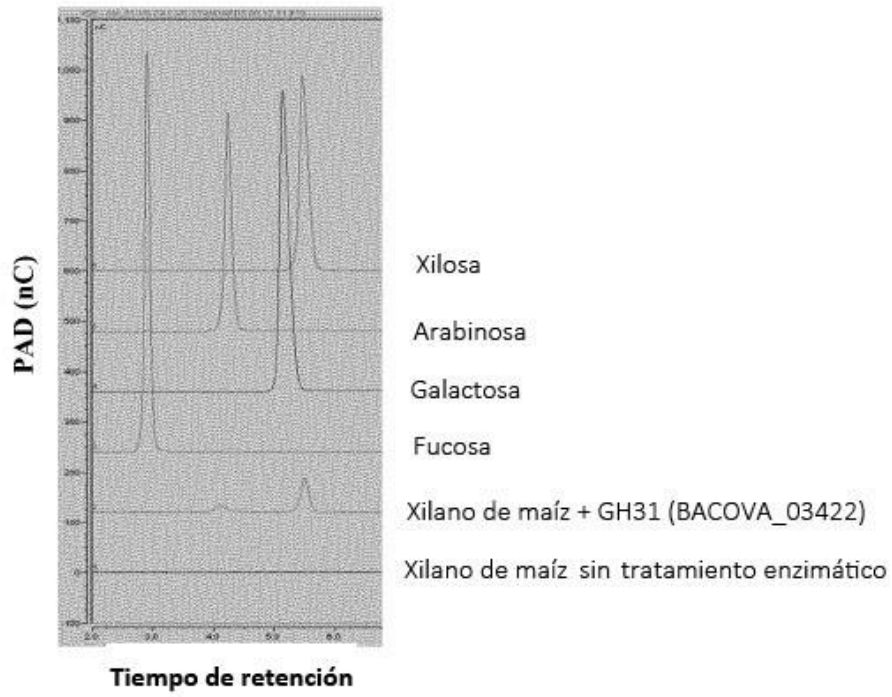


Fig. 3

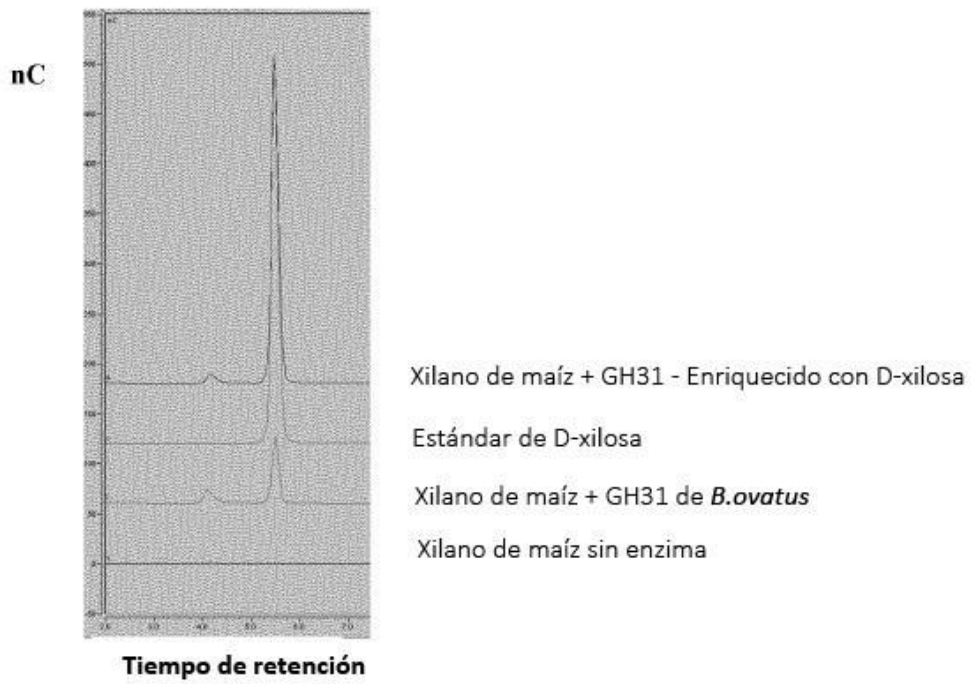


Fig. 4

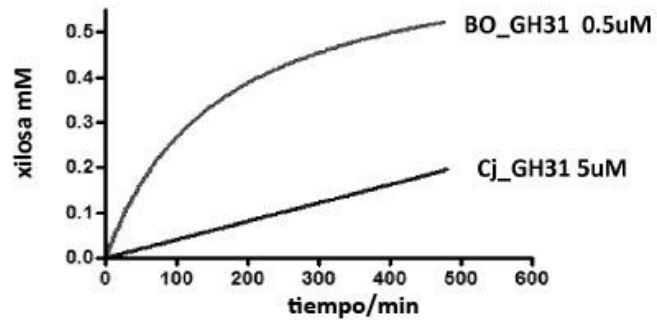
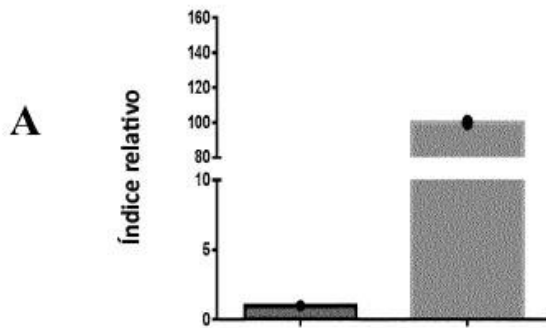


Fig. 5

GH31 vs xilano de maíz



GH31 vs XXXG

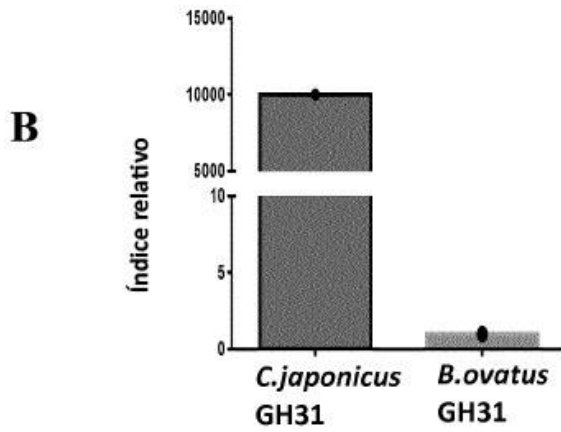


Fig. 6

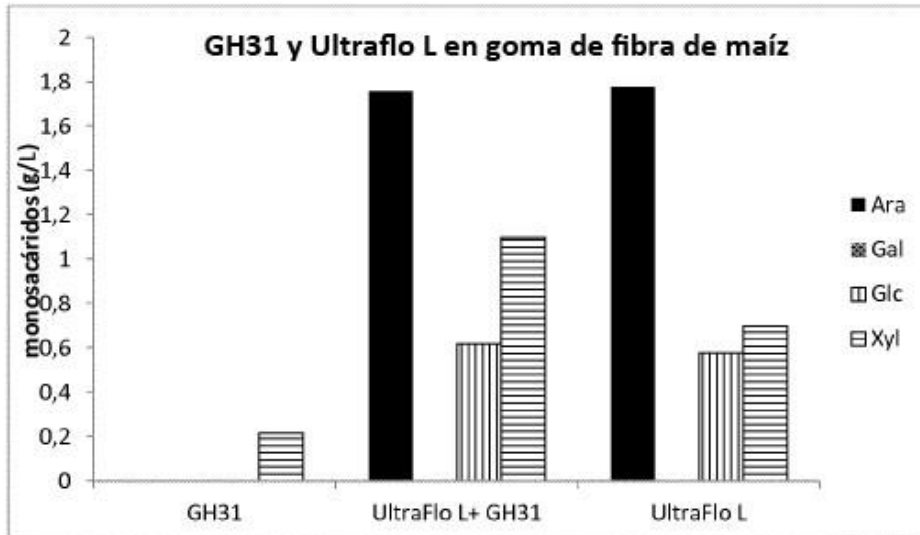


Fig. 7

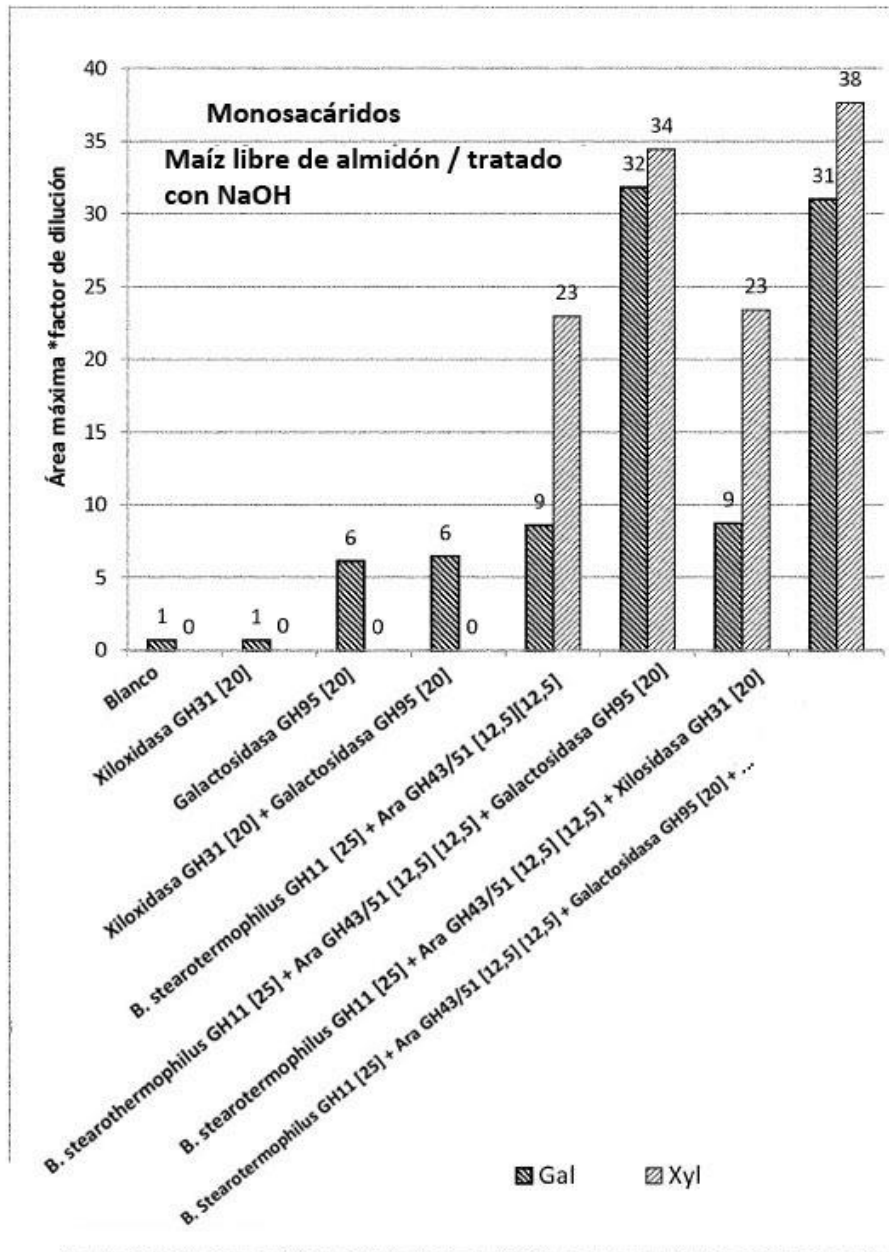


Fig. 8