



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 169 219**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

A23K 1/165 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **96900551 .1**

96 Fecha de presentación : **26.01.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0805856**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.11.1997**

54

Título: **Aditivos alimenticios para animales que comprenden xilanasa.**

30

Prioridad: **26.01.1995 DK 9495**

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.07.2002**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **01.09.2009**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **01.09.2009**

73

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

72

Inventor/es: **Hansen, Peter Kamp;**
Wagner, Peter;
Müllertz, Anette y
Knap, Inge Helmer

74

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 169 219 T5

ES 2 169 219 T5

DESCRIPCIÓN

Aditivos alimenticios para animales que comprenden xilanasa.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a aditivos alimenticios para animales, dichos aditivos comprendiendo una xilanasa según la reivindicación 1.

10 **Estado de la técnica**

A menudo los tipos y cantidades de materias primas vegetales que se pueden emplear a modo de componentes en piensos para animales serán limitados según la capacidad de dichos animales para digerirlas. Las enzimas mejoradoras para alimentos son enzimas, normalmente de origen microbiano, que al mejorar la digestibilidad de los alimentos son capaces de incrementar la eficiencia de su utilización.

Las enzimas xilanolíticas (EC 3.2.1.8) son bien conocidas como enzimas mejoradoras para alimentos. Se ha informado sobre xilanasas obtenidas a partir de cepas de *Bacillus*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Acreinonium*. Asimismo, se ha comercializado una preparación enzimática obtenida por fermentación sumergida de *Humicola insolens* (Bio-Feed™ Plus, proporcionada por Novo Nordisk NS, Dinamarca).

Se han descrito preparaciones con xilanasa obtenidas a partir de cepas del hongo *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo de *Humicola lanuginosa*) [ver, Lischnig T, Purkarthofer H y Steiner W; Biotechnology Letters 1993 15 (4) 411-414; Gomes J, Purkarthofer H, Hayn M, Kapplmüller J, Sinner M y Steiner W, Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993 39 700-707]. Sin embargo, nunca se ha descrito el uso de una xilanasa *Thermomyces lanuginosus* como una enzima mejoradora para alimentos.

Además, todas las preparaciones con xilanasa descritas en la técnica precedente se refieren a preparaciones enzimáticas complejas que incluyen componentes enzimáticos múltiples. No se ha descrito las preparaciones con xilanasa de un único componente derivadas de *Thermomyces* a través de la tecnología del ADN recombinante.

En muchas aplicaciones, el uso de preparaciones enzimáticas complejas se considera provechoso debido a un efecto sinérgico que surge de la acción cooperante de los múltiples componentes. En el caso de algunas aplicaciones, p. ej., la conversión de la lignocelulosa en combustible o materias primas líquidas, el procesamiento de alimentos y, en particular, el incremento de la digestibilidad de alimentos para animales, se considera que una mezcla de enzimas xilanolíticas y celulíticas proporcionan un rendimiento óptimo [Alam M, Gomes I, Mohiuddio G, & Hoq M M; Enzyme Microb. Technol. 1994 16 298-302].

40 **Resumen de la invención**

La presente invención provee: un aditivo alimenticio para animales; una pre-mezcla de pienso para animales; un proceso para preparar pienso para animales; y usos de una xilanasa como se define en las reivindicaciones anexas.

Según la presente invención, se ha hallado que, en comparación con las enzimas mejoradoras para alimentos convencionales, la xilanasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* es una excelente enzima mejoradora para alimentos que presenta una mejora significativa en la utilización de los alimentos cuando se añade a piensos para animales. Asimismo, debido a su excelente termoestabilidad, la preparación con xilanasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* resulta particularmente adecuada para su procesamiento en aditivos alimenticios bajo condiciones que eviten las infecciones microbianas, en particular la infección por *Salmonella*. También se ha hallado que la xilanasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* ejerce una reducción significativa en la viscosidad de la digesta, cosa que implica una mejora significativa en la eficiencia de conversión de los piensos para pollos.

Finalmente, se ha hallado sorprendentemente que la xilanasa *Thermomyces* producida por recombinación es significativamente más termoestable que la xilanasa nativa, cosa que hace que la xilanasa producida por recombinación resulte particularmente adecuada para ser procesada en aditivos alimenticios bajo condiciones que eviten las infecciones microbianas, en particular la infección por *Salmonella*.

El texto de la presente solicitud describe una preparación con xilanasa de un único componente, cuyo componente con xilanasa se obtiene mediante técnicas de ADN recombinante a partir de una cepa de *Thermomyces* o un género relacionado.

En consecuencia, en su primer aspecto, el texto de la presente solicitud describe un aditivo alimenticio para animales, dicho aditivo comprendiendo una xilanasa de un único componente derivada de una cepa de *Humicola*.

En otro aspecto, el texto de la presente solicitud describe una preparación con xilanasa de un único componente, en cuya preparación el componente de la xilanasa se deriva de una cepa de *Humicola*.

ES 2 169 219 T5

En otro aspecto, el texto de la solicitud describe un constructo de ADN que incluye una secuencia de ADN que codifica un componente de xilanasa, cuya secuencia de ADN comprende:

- a) la parte que codifica la xilanasa de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o la secuencia de ADN que se puede obtener a partir del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
- b) una secuencia de ADN análoga a la parte que codifica la xilanasa de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener a partir del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133, cuya secuencia de ADN análoga es o bien
 - i) homóloga en, como mínimo, un 80% a la parte que codifica la xilanasa de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener a partir del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
 - ii) codifica un polipéptido que es, como mínimo, homólogo en un 80 0/0 al polipéptido codificado mediante la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener a partir del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133.

En otros aspectos, el texto de la solicitud describe un vector de expresión que alberga un constructo de ADN según la invención, una célula huésped que incluye dicho constructo de ADN o vector de expresión y un método para producir una preparación con xilanasa de un único componente según la invención, cuyo método comprende cultivar dicha célula huésped bajo condiciones que permitan la producción de la enzima y la recuperación de la enzima del cultivo.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se ilustra con mayor detalle al hacer referencia a los dibujos anexos, en los que:

La Figura 1 muestra la actividad xilanolítica relativa (%) de una xilanasa de un único componente, determinada a 30°C en un margen de pH de entre 2.5-9. Parece ser que la enzima presenta un pH óptimo en el margen de 4.5-7.5, más específicamente el margen de entre 5.0-6.5, en torno a un pH de 6;

La Figura 2 muestra la actividad xilanolítica relativa (%) de una xilanasa de un único componente, determinada a un pH 5.5 en el margen de entre 30 y 80°C. Parece ser que la enzima presenta una temperatura óptima en el margen de entre 50-70°C, en torno a los 60°C;

La Figura 3 muestra la actividad residual relativa (%) de la xilanasa de un único componente (I) en comparación con aquella de la preparación con la xilanasa *Thermomyces lanuginosus* nativa (II). Se ha determinado la actividad residual a un pH 6.0 tras la incubación durante 60 minutos a 60, 65, 70 y 75°C, respectivamente.

La Figura 4 muestra los resultados de una comparación sobre la eficiencia de la reducción en la viscosidad del trigo entre una xilanasa *Thermomyces lanuginosus* nativa (●) y una preparación enzimática de varios componentes obtenida al cultivar la *Humicola insolens* (x) (dosificación (FXU/g de trigo) en la muestra);

La Figura 5 muestra los resultados de una comparación sobre la eficiencia de la reducción en la viscosidad del trigo entre una xilanasa de un único componente *Thermomyces lanuginosus* producida por recombinación (I) y una xilanasa *Thermomyces lanuginosus* nativa (II) (dosificación (FXU/g de trigo) en la muestra);

La Figura 6 muestra el valor AMEn del trigo (MJ/kg) en función de la adición de la xilanasa (FXU/kg de alimento); (A) preparación de la xilanasa de un único componente *Thermomyces lanuginosus*; (B) preparación de la xilanasa *Thermomyces lanuginosus* nativa; (C) referencia (Bio-Feed Plus CT, producto de Novo Nordisk NS, Dinamarca; una preparación enzimática de varios componentes obtenida al cultivar *Humicola insolens*); y

La Figura 7 muestra la digestión de grasa (%) en la dieta experimental, en función de la adición de la xilanasa (FXU/kg de alimento); (A) preparación de la xilanasa de un único componente *Thermomyces lanuginosus*; (B) preparación de la xilanasa *Thermomyces lanuginosus* nativa; (C) referencia (Bio-Feed Plus CT, producto de Novo Nordisk A/S Dinamarca; una preparación enzimática de varios componentes obtenida al cultivar *Humicola insolens*).

Descripción detallada de la invención

Aditivos alimenticios para animales

Al añadirse a alimentos para animales, las enzimas mejoradoras para alimentos mejoran la ruptura in vivo del material de la pared celular de las plantas en parte debido a una reducción en la viscosidad intestinal (Bedford *et al.*, Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition, 1993, págs. 73-77), con lo que se consigue que el animal obtenga una mejor utilización de los nutrientes vegetales. De ese modo, se logra mejorar el índice de crecimiento y/o nivel de conversión de los alimentos (es decir, el peso de alimento ingerido en relación al aumento de peso) del animal.

ES 2 169 219 T5

5 En el contexto de la presente invención, un aditivo alimenticio para animales es una preparación enzimática que incluye una o más enzima(s) mejoradora(s) para alimentos, así como soportes adecuados y/o excipientes, y cuya preparación enzimática se establece en una forma adecuada para ser añadida al alimento para animales. El aditivo alimenticio para animales según la invención se puede preparar según los métodos conocidos en la técnica y puede presentarse en forma de preparación seca o líquida. La enzima a incluir en la preparación puede estabilizarse opcionalmente según los métodos conocidos en la técnica.

10 En el contexto de la presente invención, un aditivo alimenticio para animales que comprende una xilanasa de un único componente es una preparación enzimática establecida en una forma adecuada para ser añadida al alimento para animales, en cuya preparación esencialmente toda la actividad xilanólítica (es decir, la actividad xilanólítica detectable) se debe a un único componente de xilanasa.

15 El aditivo alimenticio para animales según la invención puede ser un producto enzimático granulado que puede mezclarse fácilmente con otros componentes alimenticios o, más preferiblemente, a partir de un componente de una mezcla previa. El producto enzimático granulado puede estar revestido o no revestido. Se prefiere que el tamaño de partícula de los granulados enzimáticos sea compatible con el de los componentes alimenticios y el de la mezcla previa. Esto proporciona un medio seguro y conveniente para incorporar las enzimas a los alimentos.

20 Además, el aditivo alimenticio para animales según la invención puede ser una composición líquida estabilizada, que puede ser una pasta acuosa o a base de aceite.

25 El aditivo alimenticio para animales según la invención puede ejercer su efecto bien *in vitro* (al modificar los componentes alimenticios) o bien *in vivo*. El aditivo alimenticio según la invención resulta particularmente adecuado para añadirlo a composiciones de alimentos para animales que contengan elevadas cantidades de arabinoxilanos y glucuronoxilanos, por ej., alimentos que contengan cereales como la cebada, el trigo, el centeno, la avena o el maíz.

Preparaciones con xilanasa de un único componente

30 La presente invención proporciona un aditivo alimenticio para animales como se describe en la reivindicación 1.

En una forma de realización preferida, el aditivo alimenticio para animales según la invención comprende una xilanasa de un único componente derivada de una cepa de *Thermomyces*, en particular, de una cepa de *Thermomyces lanuginosus*, aunque se prefiere que sea una cepa de *Thermomyces lanuginosus*, DSM 4109, o su mutante o variante.

35 Preferiblemente, la xilanasa de un único componente se deriva de una célula huésped que transporta el gen que codifica el componente de la xilanasa. En particular la xilanasa de un único componente puede estar

- 40 a) codificada por la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N: 1, o por la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
- b) codificada por una secuencia de ADN análoga a la parte que codifica la xilanasa de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133, cuya secuencia de ADN análoga es o bien
 - 45 i) como mínimo homóloga en un 80% a la xilanasa que codifica que parte de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
 - 50 ii) codifica un polipéptido que, como mínimo, es homólogo en un 80% al polipéptido codificado por la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o

55 En otras formas de realización preferidas, la xilanasa de un único componente puede caracterizarse, además, por el hecho de que

- 60 a) presenta una actividad enzimática residual superior a un 96% tras la incubación durante 60 minutos a un pH 6.0 y 60°C;
- b) presenta una actividad enzimática residual superior a un 83% tras la incubación durante 60 minutos a un pH 6.0 y 65°C;
- 65 c) presenta una actividad enzimática residual superior a un 20% tras la incubación durante 60 minutos a un pH 6.0 y 70°C; y/o
- d) presenta una actividad enzimática residual superior a un 10% tras la incubación durante 60 minutos a un pH 6.0 y 75°C.

ES 2 169 219 T5

Secuencias de ADN análogas

Tal y como se define en la presente, se pretende que una secuencia de ADN análoga a la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1 haga referencia a cualquier secuencia de ADN que codifique una enzima xilanolítica, dicha enzima presentando una o más de las propiedades mencionadas en los apartados (i)-(iv), arriba.

La secuencia de ADN análoga se puede aislar preferiblemente de otros organismos que produzcan el componente de la xilanasas u organismos relacionados (p. ej., el mismo), basándose en la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN mostrada en la ID de SEC N°: 1, o una subsecuencia adecuada (como, por ejemplo, de 20-500 bp) derivada, por ej., al emplear los procedimientos descritos aquí y, de este modo, por ej., ser una variante alela o de una especie de la secuencia de ADN que comprende la secuencia de ADN presentada aquí.

De forma alternativa, la secuencia análoga se puede construir en base a la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o cualquier subsecuencia derivada, por ej., al introducir sustituciones nucleótidas que no originen otra secuencia de aminoácidos de la enzima xilanolítica codificada mediante la secuencia de ADN, pero que se corresponda al uso del codón del organismo huésped destinado a producir la enzima o al introducir sustituciones nucleótidas que puedan originar una secuencia de aminoácidos diferente.

Al llevar a cabo las sustituciones nucleótidas, se prefiere que los cambios aminoácidos sean de naturaleza menor es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos que no influyan significativamente sobre el plegado de proteínas o la actividad proteínica, pequeñas eliminaciones, normalmente entre uno y aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de los terminales amino o carboxilo, como un residuo de metionina aminoterminal, un péptido de enlace pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos o una pequeña extensión que facilite la purificación, como por ejemplo un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de enlace. Algunos ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran dentro del grupo de aminoácidos básicos (como la arginina, la lisina y la histidina), aminoácidos ácidos (como el ácido glutámico y el ácido aspártico), aminoácidos polares (como la glutamina y la asparaguina), aminoácidos hidrofóbicos (como la leucina, la isoleucina y la valina), aminoácidos aromáticos (como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina) y aminoácidos menores (como la glicina, la alanina, la serina, la treonina y la metionina). Para una descripción general de la sustitución nucleótida ver, por ej., Ford *et al.*, Protein Expression and Purification, 2 1991 95-107.

A los expertos en la materia les resultará evidente que este tipo de sustituciones se pueden llevar a cabo fuera de las regiones fundamentales para la función de la molécula y que, aún así, pueden tener como resultado una enzima xilanolítica activa. Los aminoácidos esenciales de la actividad de la xilanasas codificada mediante el constructo de ADN según la invención y, en consecuencia, preferiblemente sujetas a sustitución, se pueden identificar según los procedimientos conocidos en la técnica, como la mutagénesis dirigida o la mutagénesis de escaneado de alanina (ver, p. ej., Cunningham y Wells, Science 1989 244 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo de la molécula y se somete a examen las moléculas mutantes resultantes para detectar la actividad biológica (es decir, proteolítica) para identificar los residuos aminoácidos fundamentales para la actividad molecular. Los lugares de interacción sustrato-enzima también se pueden determinar mediante un análisis de la estructura cristalina según se determina mediante este tipo de técnicas como el análisis de resonancia magnética nuclear, la cristalografía o el marcado por fotoafinidad (ver, por ej., de Vos *et al.*, Science 1992 255 306-312; Smith *et al.*, J. Mol. Biol. 1992 224 899-904; Wlodaver *et al.*, FEBS Lett. 1992 309 59-64).

Se entenderá que la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o cualquier subsecuencia derivada, se puede emplear como ensayos para aislar la secuencia de ADN completa que codifica la enzima xilanolítica, por ej., la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1.

La homología a la que se hace referencia en i) se determina como el grado de identidad entre las dos secuencias que indican una derivación de la primera secuencia con respecto a la segunda. La homología se puede determinar de forma idónea mediante programas informáticos conocidos en la materia como GAP establecidos en el paquete del programa GCG (Needleman S B & Wunsch C D; J. Mol. Biol. 1970 48 443-453). Uso del GAP con las siguientes disposiciones para comparar la secuencia de ADN: penalización de creación GAP de 5.0 y penalización de extensión GAP de 0.3, la zona de codificación de la secuencia de ADN muestra un grado de identidad preferiblemente de al menos un 70%, en particular al menos de un 80%, al menos del 85%, al menos del 90% o incluso al menos del 95% en relación a la zona de codificación de la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN mostrada en la ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133.

Se pretende que la hibridación a la que se hace referencia en (ii) indique que la secuencia de ADN análoga hibrida la misma muestra de oligonucleótido que la secuencia de ADN que codifica el componente de xilanasas bajo determinadas condiciones especificadas descritas con detalle en la sección sobre materiales y métodos, a continuación. La muestra se puede construir de manera conveniente en base a la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN de la ID de SEC N° 1, o una subsecuencia derivada que codifica al menos 6-7 aminoácidos de la enzima, o en base a la secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en la ID de SEC N° 2. En este último caso, la muestra se obtiene a partir de una subsecuencia aminoácida que se corresponde a un alto número de codones degenerados inferiores.

Normalmente, la secuencia de ADN análoga es altamente homóloga a la secuencia de ADN en, al menos, un 70% a la secuencia que se muestra en la ID de SEC N°: 1 que codifica un componente de xilanasas según la invención, preferiblemente al menos en un 80%, en particular al menos en un 85%, aunque se prefiere que sea al menos en un 90% o incluso como mínimo que sea homóloga en un 95% a la secuencia que se muestra en la ID de SEC N°: 1.

5 El grado de homología al que se hace referencia en (iii) arriba se determina como el grado de identidad entre las dos secuencias que indican una derivación de la primera secuencia en relación a la segunda. La homología se puede determinar de forma idónea mediante programas informáticos conocidos en la materia como, por ej., el GAP establecido en el paquete del programa GCG (Needleman S B & Wunsch C D; J. Mol. Biol., 1970 48 443-453). Uso
10 del GAP con las siguientes disposiciones para comparar la secuencia polipéptida: penalización de creación GAP de 3.0 y penalización de extensión GAP de 0.1, el polipéptido codificado mediante una secuencia de ADN análoga muestra un grado de identidad preferiblemente de, como mínimo, un 70%, en particular como mínimo de un 80%, aunque se prefiere que sea como mínimo de un 85%, al menos de un 90% o incluso como mínimo de un 95%, en relación a la enzima codificada mediante un constructo de ADN que comprende la parte que codifica la xilanasas de la secuencia
15 de ADN que se muestra en la ID de SEC N°: 1 o la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133.

Según el método descrito anteriormente, la homología del ADN de la xilanasas según la invención contra la mayor parte de las xilanasas de la técnica precedente se determinó al emplear el programa informático GAP. La xilanasas según la invención mostró sólo una homología del 63% en el ADN en relación con la xilanasas I de *Trichoderma reesei* (Torronen A *et al.*, Biotechnology 1992 10 111461-1465) y una homología del 63% en el ADN en relación a una xilanasas I de *Cochliobolus carbonum* (Apel P C *et al.*; Mol. Plan Microb. Interact. 1993 6 467-473).

Se pretende que el término “derivado de” en conexión con la propiedad (iv) anteriormente mencionada no sólo haga referencia a un componente de xilanasas producida mediante la cepa *Thermomyces lanuginosus*, DSM 4109, sino también un componente de xilanasas codificado mediante una secuencia de ADN aislada de esta cepa y producida en una célula huésped transformada con dicha secuencia de ADN. La reactividad inmunológica se puede determinar a través del método descrito en la sección de materiales y métodos que sigue a continuación.

30 *Enzimas mejoradoras de alimentos*

En otra forma de realización preferida, el aditivo alimenticio de la invención puede comprender enzimas mejoradoras de alimentos adicionales.

35 En el contexto de la presente invención, las enzimas mejoradoras de alimentos comprenden, aunque no se limitan sólo a éstas, las α -galactosidasas, β -galactosidasas, en particular las lactasas, fitasas, β -glucanasas, en particular las endo- β -1,4-glucanasas y las endo- β -1,3(4)-glucanasas, las xilanasas, xilosidasas, galactanasas, en particular las endo-1,4- β -galactosidasas de arabinogalactano y las endo-1,3- β -galactosidasas de arabinogalactano, las endoglucanasas, en particular la endo-1,2- β -glucanasa, la endo-1,3- α -glucanasa y la endo-1,3- β -glucanasa, enzimas que degradan la pectina,
40 en particular las pectinasas, pectinesterasas, pectin liasas, poligalacturonasas, ramnogalacturonasas, esterasas acetilicas de ramnogalacturonano, ramnogalacturonan- α -ramnosidasas, pectato liasas y α -galacturonisidasas, mananasas, β -manosidasas, esterasas acetilicas de manano, esterasas acetilicas de xilano, proteasas y enzimas lipolíticas como, por ejemplo, las lipasas y las cutinasas.

45 *Fuentes microbianas*

La presente invención se refiere a un aditivo alimenticio para animales, dicho aditivo incluyendo una xilanasas derivada de una cepa que pertenece al grupo de hongos termófilos, es decir, *Thermomyces*, o un género relacionado.

50 El género *Thermomyces*, que engloba varias especies [Appinis & Eggs; 1966], más específicamente la especie *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo de *Humicola lanuginosa*), se ha asociado tradicionalmente con el grupo de hongos termófilos [Cooney & Emerson; 1964]. Se ha demostrado que varios de los géneros que pertenecen a este grupo, por ej., la especie de *Humicola*, *Thermoascus*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Talaromyces*, *Malbranchea*, *Myceliophthora* y *Thielavia*, [Cooney & Emerson; 1964] son productores de enzimas muy potentes. También se han asociado a este
55 grupo la *Byssoschlamus* y la *Paecilomyces*.

La afiliación taxonómica de *Thermomyces* generalmente se reconoce como incierta. Sin embargo, la base de datos Entrez del National Institute of Health (instituto Nacional de Sanidad) (actualizada en enero de 1996) clasifica la *Thermomyces* como una *Pyrenomycete* mitospórica (es decir, una *Pyrenomycete* que sólo se caracteriza de forma
60 incompleta, sin dar información suficiente como para asociarla ni a una orden específica ni a una familia específica).

Los estudios moleculares más recientes han tratado de dilucidar la secuencia 18S-RNA de *Thermomyces* con el objetivo de emplear esta información para seguir clarificando la relación filogenética de este género. La posible interpretación de los datos disponibles sugiere que la *Thermomyces* se afilia más de cerca a los hongos reagrupados bajo el nombre de *Plectomycetes*, en particular bajo el de *Erotiales*. A través de la búsqueda de homología en la base de datos, la secuencia 18S-RNA de *Byssoschlamus* es la secuencia más relacionada con la secuencia descrita de *Thermomyces lanuginosus* (Novo Nordisk 1996, datos inéditos). Si los estudios de casos más aislados que pertenecen al género *Thermomyces* apoyan las conclusiones preliminares, también podrían apoyar una transferencia del género

ES 2 169 219 T5

Thermomyces a la orden *Plectomycetes*. En consecuencia, la presente invención también se refiere a preparaciones con xilanas derivadas de *Plectomycetes*, más en particular de *Erotiales*.

5 Se llevó a cabo una búsqueda de homología con la xilanasa según la invención contra las bases de datos de nucleótidos y proteínicas. La búsqueda de homología mostró que las xilanasas más relacionadas eran la xilanasas I de *Trichoderma reesei* y la xilanasas I de *Cochliobolus carbonum*. Ambas xilanasas pertenecen a familia 11 de las glicosil hidrolasas (Henrissat B; Biochem. J. 1991 280 309-316), cosa que indica que la xilanasas según la invención también pertenece a esta familia.

10 Se han depositado las diferentes muestras de *Thermomyces lanuginosus* y se encuentran disponibles al público en las autoridades depositarias internacionales reconocidas por el Tratado de Budapest, por ej., la American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EEUU. Se ha depositado una cepa de *Thermomyces lanuginosus* según el Tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Cellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, DE-3300 Braunschweig, Alemania, el 4 de mayo de 1987 y se le ha asignado el N° de registro DSM 4109.

15 Se depositó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133, que contenía el ADN del plásmido que comprende la secuencia de ADN de longitud completa presentada como ID de SEC N°: 1, y que codifica la endoglucanasa según la invención, en el vector de la levadura pYES 2.0, según el Tratado de Budapest en el International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Cellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, DE-3300 Braunschweig, Alemania, el 19 de julio de 1995 y se le asignó el N° de registro DSM 10133.

25 *Constructos de ADN*

En otro aspecto más, el texto de la solicitud describe un constructo de ADN que incluye una secuencia de ADN que codifica un componente de xilanasas, dicha secuencia de ADN incluyendo:

- 30 a) la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
- 35 b) una secuencia de ADN análoga a la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener a partir del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133, cuya secuencia de ADN análoga es o bien
- 40 i) homóloga en, al menos, un 80% a la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
- 45 ii) codifica un polipéptido que es homólogo en, al menos, un 80% al polipéptido codificado por la secuencia de ADN presentada como ID de SEC N°: 1, o a la secuencia de ADN que se puede obtener a partir del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133.

Tal y como se define aquí, el término “constructo de ADN” se pretende que haga referencia a cualquier molécula de ácido nucleico de origen ADNc, ADN genómico, ADN o ARN sintético. Se pretende que el término “constructo” haga referencia a un segmento del ácido nucleico que puede ser mono o bicatenario y que se puede basar en una secuencia nucleotídica completa o parcial que codifique la xilanasas de interés. El constructo puede contener opcionalmente otros segmentos de ácido nucleico.

55 El constructo de ADN que codifica la enzima xilanolítica puede ser idóneamente de origen genómico o ADNc, por ejemplo, cuando se obtiene al preparar una biblioteca genómica o de ADNc y al seleccionar las secuencias de ADN que codifican por hibridación todas las enzimas xilanolíticas o parte de éstas usando muestras de oligonucleótido sintético según las técnicas estándares (ver, por ej., Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

60 El constructo de ácido nucleico que codifica el xilanolítico también se puede preparar de forma sintética a través de los métodos estándares establecidos, por ej., el método de la fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 1981 22 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, EMBO Journal 1984 3 801-805. Según el método de la fosfoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, p. ej. en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se anellan, se ligan y se clonan en vectores adecuados.

65 Además, el constructo de ácido nucleico puede ser de origen mixto sintético y genómico, sintético y de ADNc o genómico y de ADNc preparado al ligar los fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según resulte apropiado), los fragmentos correspondientes a diferentes partes del constructo de ácido nucleico completo, según las técnicas estándares.

ES 2 169 219 T5

El constructo de ácido nucleico también se puede preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa al emplear cebadores específicos como, por ejemplo, los descritos en la US 4,683,202 o por Saiki *et al.*, Science 1988 239 487-491.

5 La secuencia de ADN que codifica un componente de xilanasas puede derivar de una cepa de *Humicola*, una cepa de *Thermoascus*, una cepa de *Chaetomium*, una cepa de *Mucor*, una cepa de *Talromyces*, una cepa de *Maibranchaea*, una cepa de *Myceliophthora*, una cepa de *Thielavia*, una cepa de *Byssachlamus* o una cepa de *Paecilomyces*.

10 En una forma de realización preferida, la secuencia de ADN que codifica el componente de xilanasas se deriva de una cepa de *Thermomyces*, más en particular una cepa de *Thermomyces lanuginosus*. En la forma de realización preferida, la secuencia de ADN se deriva o se produce de una biblioteca de ADN de *Thermomyces lanuginosus*, DSM 4109, o su mutante o variante.

15 La secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica se puede aislar a través de métodos convencionales; dichos métodos normalmente implican:

- clonar, en un vector adecuado, una biblioteca de ADNc, p. ej., de la cepa *Thermomyces lanuginosus*, DSM 4109, o del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133,
- 20 - transformar una célula huésped adecuada con dicho vector,
- cultivar la célula huésped bajo condiciones adecuadas para expresar la enzima xilanolítica deseada codificada por uno o más clones en la biblioteca de ADNc,
- 25 - seleccionar los clones positivos para determinar cualquier actividad xilanolítica de la enzima producida por este tipo de clones, y
- aislar el ADN que codifica la enzima xilanolítica deseada a partir de este tipo de clones.

30 Se ha descrito un método general en la WO 93/11249, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia. En el Ejemplo 1 a continuación se encuentra una descripción más detallada del método de selección.

35 La secuencia de ADN que codifica un componente de xilanasas se puede aislar, por ejemplo, al seleccionar una biblioteca de ADNc de una cepa de *Thermomyces lanuginosus* y seleccionar los clones que expresan la enzima xilanolítica (por ej., en el modo definido por la capacidad de la enzima para hidrolizar los enlaces 1,4- β -xilósidos en 1,4- β -xilanos). A continuación, se puede aislar la secuencia de ADN apropiada del clon a través de los procedimientos estándares, por ej., como el descrito en el Ejemplo 1.

40 En una forma de realización preferida en la actualidad, el constructo de ácido nucleico comprende la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN que se muestra en la ID de SEC N°: 1, en cualquier subsecuencia derivada, pero que difiere de la secuencia de ADN que se muestra en la ID de SEC N°: 1 en lo que se refiere a la degeneración del código genético. La invención comprende, además, secuencias de ácidos nucleicos que hibridan una molécula de ácido nucleico (bien genómico, sintético o de ADNc o ARN) que codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en la ID de SEC N°: 2, o cualquier subsecuencia derivada, bajo las condiciones descritas a continuación.

45 *Vectores de expresión recombinantes*

En otro aspecto, la invención establece un vector de expresión recombinante que incluye el constructo de ADN según la invención.

50 El vector de expresión recombinante según la invención puede ser cualquier vector que pueda someterse de manera conveniente a procedimientos de ADN recombinante y la elección de dicho vector a menudo depende de la célula huésped en la que se debe introducir. En consecuencia, el vector puede ser un vector de replicación autónomo, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido. De forma alternativa, el vector puede ser un vector que, al introducirlo en una célula huésped, se integre en el genoma huésped celular y se replique junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se haya integrado.

60 En el vector de expresión según la invención, se prefiere que la secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica se enlace de forma que se pueda operar con los segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN. En general, el vector de expresión se deriva de ADN plásmido o viral o bien puede contener elementos de ambos. El término "enlazado de forma que se pueda operar" indica que los segmentos se disponen de modo que funcionen de acuerdo con los objetivos pretendidos, por ej., la transcripción comienza en un promotor y continúa a través de la secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica.

65 En consecuencia, en el vector de expresión según la invención, la secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica se conectaría de forma que se pudiera operar a un promotor adecuado y a una secuencia de terminación.

ES 2 169 219 T5

El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y pueda derivarse de genes que codifiquen proteínas bien homólogas o bien heterólogas a la célula huésped.

5 Algunos ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica la enzima xilanolítica según la invención en células huésped bacterianas incluyen el promotor del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa BAN de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* o el gen de la xilosidasa o xilanasa de *Bacillus pumilus*, o mediante los promotores P_R o P_L del fago Lambda o los promotores lac, trp o tac de *E. Coli*.

10 Algunos ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped de levadura incluyen los promotores de genes glicolíticos de levadura (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255 (1980), 12073-12080; Alber y Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1 (1982), 419-434) o los genes de la alcohol dehidrogenasa (Young *et al.*, en Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender *et al.*, eds.), Plenum Press, Nueva York 1982) o los promotores TPII (US 4,599,311) o ADH2-4c (Russell *et al.*, Nature 304 (1983), 652-654).

15 Algunos ejemplos de promotores adecuados para su uso en células huésped derivadas de un hongo filamentosos son, por ejemplo, el promotor ADH3 (McKnight *et al.*, The EMBO J. 4 (1985), 2093-2099) o el promotor tpiA. Entre los ejemplos de otros promotores útiles se encuentran los derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la α -amilasa neutral de *Aspergillus niger*, la α -amilasa ácida estable de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa (gluA) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, la isomerasa de fosfato triosa de *Aspergillus oryzae* o la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*. Se prefieren los promotores TAKA-amilasa y gluA.

25 El vector de expresión también puede comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. El vector de expresión también puede comprender un marcador seleccionable, por ej., un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped, como el gen que codifica la reductasa de dihidrofolato (DHFR) o el gen TPI de *Schizosaccharomyces pombe* (descrito por Russell P R, Gene 1985 40 125-130) o un gen que confiera resistencia a un medicamento, por ej., a la ampicilina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato. En el caso de los hongos filamentosos, entre los marcadores seleccionables se incluyen amdS, pyrC, argB, niaD y sC.

35 Para dirigir la enzima xilanolítica hacia el vehículo secretor de las células huésped, se puede introducir una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia guía, preprosecuencia o presecuencia) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras normalmente se sitúan en la posición 5' en la secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica. La secuencia señal secretora puede asociarse por lo general con la enzima xilanolítica o puede derivarse de un gen que codifique otra proteína segregada.

40 En una forma de realización preferida, el vector de expresión puede comprender una secuencia señal secretora sustancialmente idéntica a la señal secretora que codifica la secuencia del gen de α -amilasa del *Bacillus licheniformis*, por ej., como se describe en la WO 86/05812.

45 Asimismo, se puede tomar las medidas para amplificar la expresión, por ej., mediante técnicas de amplificación en serie, que impliquen un entrecruzamiento simple o doble, o mediante técnicas multicopia, por ej., como se describe en la US 4,959,316 o en la WO 91/09129. De forma alternativa, el vector de expresión puede incluir una temperatura origen de replicación sensible, por ej., como se describe en la EP 283,075.

50 Los procedimientos para ligar las secuencias de ADN que codifican la enzima xilanolítica, el promotor y opcionalmente el terminador y/o secuencia señal secretora, respectivamente y para insertarlas en vectores adecuados que contengan la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY. 1989).

55 Células huésped

En otro aspecto, el texto de la solicitud describe una célula huésped que incluye el constructo de ADN según la invención y/o el vector de expresión recombinante.

60 El constructo de ADN puede ser bien homólogo o bien heterólogo en relación al huésped en cuestión. En caso de ser homólogo a la célula huésped, es decir, producido por la célula huésped en la naturaleza, éste normalmente se conectará de forma que se pueda operar con otra secuencia promotora o, en caso de ser aplicable, otra secuencia señal secretora y/o secuencia de terminación diferente a la de su ambiente natural. En este contexto, el término "homólogo" se pretende que incluya una secuencia ADNc que codifica una enzima xilanolítica nativa en relación al organismo huésped en cuestión. El término "heterólogo" se pretende que incluya una secuencia de ADN no expresada por la célula huésped en la naturaleza. En consecuencia, la secuencia de ADN puede derivarse de otro organismo o puede ser una secuencia sintética.

ES 2 169 219 T5

La célula huésped en la que hay que introducir el constructo de ADN o el vector de expresión recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir la enzima xilanolítica e incluye bacterias, levadura, hongos y células eucarióticas superiores.

5 Algunos ejemplos de células huésped bacterianas que, tras el cultivo, son capaces de producir la enzima xilanolítica según la invención son bacterias gram positivas como las cepas de *Bacillus*, en particular una cepa de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megatherium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis* o *Bacillus agaradherens*, o cepas de *Streptomyces*, en particular una cepa de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas como la *Escherichia coli*. La transformación de las bacterias se puede llevar a cabo transformando el protoplasto o empleando células competentes conocidas en cierto modo *per se* (ver, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

15 Cuando se expresa la enzima xilanolítica en bacterias como la *Escherichia coli*, se puede retener la xilanasa en el citoplasma, normalmente a modo de gránulos insolubles (conocidos como cuerpos de inclusión) o se puede dirigir al espacio periplásmico mediante una secuencia de secreción bacteriana. En el caso anterior, las células se lisifican y los gránulos se recuperan y desnaturalizan. Tras esto se vuelve a plegar la enzima xilanolítica diluyendo el agente desnaturalizante. En el último caso, la enzima xilanolítica se puede recuperar del espacio periplásmico dividiendo las células, por ej., mediante sonicación o impacto osmótico, para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la enzima xilanolítica.

20 Entre los ejemplos de células de levaduras adecuadas se incluyen las células de *Saccharomyces* sp., en particular las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyveri* y *Saccharomyces uvarum*, las células de *Saccharomyces* sp., como la *Schizosaccharomyces pombe*, las células de *Kluyveromyces*, como la *Kluyveromyces lactis*, las células de *Hansenula*, p. ej., la *Hansenula polymorpha*, las células de *Pichia*, p. ej., la *Pichia pastoris* (ver, Gleeson *et al.*, J. Gen. Microbiol. 132, 1986, págs. 3459-3465; US 4,882,279) y las células de *Yarrowia* sp. como la *Yarrowia lipolytica*. Los métodos para transformar las células de levadura con ADN heterólogo y para producir polipéptidos heterólogos derivados aparecen descritos, por ej., en US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743 y US 4,845,075, todas ellas incorporadas aquí como referencia. Las células transformadas se seleccionan mediante un fenotipo determinado por un marcador seleccionable, la resistencia común al medicamento o la capacidad de crecer en ausencia de un nutriente particular, p. ej., la leucina. Un vector preferido para su uso en levadura es el vector POT1 descrito en US 4,931,373. La secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica según la invención puede ir precedida por una secuencia señal y, opcionalmente, por una secuencia líder, p. ej., como la descrita anteriormente.

35 Algunos ejemplos de otras células micóticas son células de hongos filamentosos, por ej., *Aspergillus* sp., en particular las cepas de *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus niger*, *Neurospora* sp., *Fusarium* sp., en particular las cepas de *Fusarium oxysporum* o *Fusarium graminearum*, o *Trichoderma* sp. Las células micóticas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación y transformación del protoplasto seguido de la regeneración de la membrana celular conocida en cierto modo *per se*. Se ha descrito el uso de *Aspergillus* sp. para expresar proteínas, p. ej., en EP 272,277 y en EP 230,023. La transformación de *F. oxysporum* puede, por ejemplo, llevarse a cabo en el modo descrito por Malardier *et al.*, Gene 1989 78 147-156. El uso de *Aspergillus* como microorganismo huésped aparece descrito, p. ej., en EP 238 023, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia.

45 En una forma de realización preferida, la célula huésped es una cepa de *Aspergillus oryzae*.

Métodos para producir una preparación de un único componente

50 En otro aspecto más, el presente texto de la solicitud describe un método para producir la enzima xilanolítica según la invención, en el que una célula huésped adecuada, transformada mediante una secuencia de ADN que codifica la enzima xilanolítica, se cultiva bajo condiciones que permiten la producción de la enzima y la enzima resultante se recupera del cultivo.

55 En otro aspecto, el presente texto de la solicitud describe un método para producir una preparación con xilanasa de un único componente, en el que se cultiva una célula huésped adecuada transformada con una secuencia de ADN que codifica la enzima bajo condiciones que permiten la producción del componente de xilanasa, seguido de la recuperación de dicho componente de xilanasa del cultivo.

60 En una forma de realización preferida, la secuencia de ADN que codifica la enzima es un constructo de ADN obtenido en el modo descrito anteriormente.

En otra forma de realización preferida, el constructo de ADN se combina con una señal de expresión apropiada en un vector de expresión como el descrito anteriormente.

65 En otra forma de realización preferida, la célula huésped es una de las células descritas anteriormente.

El medio usado para cultivar las células huésped transformadas puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de las células huésped en cuestión. La enzima xilanolítica expresada puede segregarse de forma conveniente en el medio de cultivo y se puede recuperar de éste a través de procedimientos de purificación. Los pro-

ES 2 169 219 T5

cedimientos de purificación bien conocidos incluyen la separación de las células del medio mediante centrifugado o filtración, la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal como, por ejemplo, sulfato amónico y métodos cromatográficos como, p. ej., la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de afinidad.

5

Ejemplos

La invención se ilustra con más detalle haciendo referencia a los siguientes ejemplos que no se pretende de ningún modo que limiten el objetivo de la invención según se reivindica.

10

Materiales y métodos

Organismo donante

15

Se aisló el ARNm de *Thermomyces lanuginosus*, DSM 4109, crecido en un xilano que contenía el medio de fermentación removido para garantizar una aireación suficiente. Se recogieron los micelios tras 3-5 días de crecimiento, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Cepas de levadura

20

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* usada a continuación es JG169 (MAT α ; ura 3-52; leu 2-3, 112; his 3-D200; pep 4-113; prcl::HIS3; prbl::LEU2; cir+).

Plásmidos

25

Para llevar a cabo la expresión, se empleó el plásmido pYES 2.0 de levadura comercialmente disponible (Invitrogen).

30

El vector de expresión pHD414 de *Aspergillus* es un derivado del plásmido p775, descrito en la EP 238 023. La construcción de pHD414 aparece descrita, además, en WO 93/11249.

Extracción del ARN total

35

La extracción del ARN total se llevó a cabo con tiocianato guanidinio seguido de un ultracentrifugado a través de una almohadilla de 5.7 M de CsCl y del aislamiento del poli(A)+ANR por cromatografía de afinidad de oligo(dT)-celulosa usando los procedimientos descritos en WO 93/11249.

Síntesis y modificación del ADNc

40

Se sintetizó el ADNc bicatenario a partir de 5 μ g de poli(A)+ARN mediante el método de la fibronucleasa H (Gubler U, Hoffman B J, Gene 1983 25 263-269; Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY, 1989) usando la modificación del tubo refrigerador. El procedimiento aparece descrito, además, en WO 93/11249.

45

Tras haberlo tratado con la nucleasa de judía mung, se hizo el extremo romo del ADNc ds con la ADN polimerasa T4 (Invitrogen) y se ligó el ADNc con los adaptadores BstX I no palindrómicos (1 μ g/l, Invitrogen) según las instrucciones de los fabricantes.

Construcción de bibliotecas de ADNc

50

Se recuperó el ADNc ds adaptado al centrifugarlo, lavarlo en un 70% de EtOH y al volverlo a suspender en 25 ml de H₂O. Antes de la ligadura de bibliotecas a gran escala, se llevó a cabo cuatro ligaduras de ensayo en 10 μ l de tampón de ligación (el mismo que arriba), cada uno de ellos conteniendo 1 μ l de ADNc ds (tubos de reacción #1 - #3), 2 unidades de ligasa T4 (Invitrogen) y 50 ng (tubo #1), 100 ng (tubo #2) y 200 ng (tubos #3 y #4) de vector de expresión de levadura dividido con Bst XI (o bien el vector pYES 2.0, Invitrogen, o yHD13).

55

Usando las condiciones óptimas, se creó una ligadura a gran escala en 40 μ l de tampón de ligación. Se transformó una parte alícuota de 1 μ l en 1061 células electrocompetentes de *E. coli*, se trituraron las células transformadas y la biblioteca se colocó en placas de ampicilina LB + con 5000-7000 c.f.u./placa. A cada placa se le añadieron 3 ml de medio. Se extrajeron las bacterias raspándolas, se añadió 1 ml de glicerol y se almacenó a -80°C como agregados. Los 2 ml restantes se emplearon para aislar el ADN. Para obtener más detalles sobre este método, se hace referencia a la WO 94/14952.

60

Construcción de bibliotecas de levadura

65

Para asegurar que todos los clones bacterianos se sometían a examen en levadura, se establecieron varios transformantes de levadura 5 veces mayores al número de clones bacterianos de los agregados originales como límite.

ES 2 169 219 T5

Se sometió a electroporación una parte alícuota de 1 μ l de ADN del plásmido purificado (100 ng/ μ l) de agregados individuales (200 Ω , 1,5 kV, 25 μ F) en 40 μ l de células JG169 competentes de *Saccharomyces cerevisiae* ($OD_{600} = 1,5$ en 500 ml de YPD), se lavó dos veces en DIW frío, una vez en 1 M de sorbitol frío, se resuspendió en 0,5 ml de 1 M de sorbitol (Becker D M Guarante L, Methods Enzymol. 1991 194 182-187). Tras añadir 1 ml de 1 M de sorbitol frío, se colocaron partes alícuotas de 80 μ l en placas en SC + glucosa - uracilo para dar como resultado 250-400 c.f.u./placa y se incubó a 30°C durante 3-5 días.

Identificación de colonias positivas

Tras 3-5 días de crecimiento, las placas de agar se replicaron con placas de SC-Uracil que contenían un 0,2% de xilano de abedul reticulado con azurina (xilano de abedul AZCLTM, MegazymeTM, Australia) y un 2% de galactosa, seguido de la incubación durante 2-4 días a 30°C para detectar la actividad xilanolítica. Tras la incubación, se identificaron las colonias de enzimas positivas xilanolíticas como aquellas colonias con un halo azul a su alrededor.

Las células de colonias de enzimas positivas se extendieron para aislar una única colonia en agar y se seleccionó una colonia única productora de enzimas para cada una de las colonias productoras de enzimas xilanolíticas identificadas.

Caracterización de clones positivos

Se obtuvieron clones positivos como colonias únicas. El ADN del plásmido se aisló de un cultivo celular obtenido de dos colonias de levadura positivas. Se introdujo el ADN del plásmido (transformado) en *E. coli*, se aisló y se caracterizó de manera individual secuenciando el extremo 5' de cada clon de ADNc usando el método de terminación de cadena (Sanger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EEUU 1977 74 5463-5467) y el sistema de SequenaseTM (United States Biochemical).

Aislamiento de un gen de ADNc para su expresión en Aspergillus

Se inocularon una o más colonias de levadura productoras de enzimas xilanolíticas en 20 ml de caldo YNB- 1 en un tubo de ensayo de cristal de 50 ml. Se removió el tubo durante 2 días a 30°C. Se recogieron las células centrifugándolas durante 10 minutos a 3000 rpm.

El ADN, aislado según WO 94/14952, se disolvió en 50 μ l de agua. La parte alícuota del ADN se transformó con *E. coli* en el modo descrito en WO 94/14952. Se aisló el ADN del plásmido de *E. coli* mediante procedimientos estándares y se analizó mediante un análisis de enzimas de restricción. Se escindió el inserto de ADNc mediante enzimas de restricción apropiadas y se ligó en un vector de expresión de *Aspergillus*.

Transformación de Aspergillus oryzae o Aspergillus niger

Procedimiento general

Se inocularon 100 ml de YPD (Sherman *et al.*, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981) con esporas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger* y se incubó mientras se removía a 37°C durante aproximadamente 2 días. Se recogió el micelio por filtración y se lavó con 200 ml de 0,6 M de MgSO₄. Se suspendió el micelio en 15 ml de 1,2 M de MgSO₄ y 10 mM de NaH₂PO₄, pH 5.8. Se dejó que la suspensión se enfriara en hielo y se añadió 1 ml de tampón que contenía 120 mg de NovozymTM 234, lote 1687. Tras 5 minutos se añadió 1 ml de 12 mg/ml de BSA (Sigma, tipo H25) y se agitó mientras se removía de forma suave y continuada durante 1,5-2,5 horas a 37°C hasta que se pudo observar un gran número de protoplastos en una muestra inspeccionada con microscopio.

Se filtró la suspensión mediante un miracloth, se transfirió el filtrado a un tubo estéril y se recubrió con 5 ml de 0,6 M de sorbitol, 100 mM de Tris-Cl, pH 7.0. El centrifugado se llevó a cabo durante 15 minutos a 100 g y se recogieron los protoplastos de la parte superior de la almohadilla de MgSO₄. Se agregaron 2 volúmenes de STC (1,2 M de sorbitol, 10 mM de Tris-Cl, pH 7.5, 10 mM de CaCl₂) a la suspensión del protoplasto y la mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 1000 g. El granulado del protoplasto se resuspendió en 3 ml de STC y se volvió a granular. Se repitió este proceso. Finalmente, se resuspendieron los protoplastos en 0,2-1 ml de STC.

Se mezclaron 100 μ l de suspensión de protoplastos con 5-25 μ g del ADN apropiado en 10 μ l de STC. Se mezclaron los protoplastos con p3SR2 (un plásmido que transporta el gen amdS del *Aspergillus nidulans*). Se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 25 minutos, Se añadieron 0,2 ml de PEG 4000 al 60% (BDH 29576). Se añadió 10 mM de CaCl₂ y 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5, se mezcló cuidadosamente (dos veces) y, finalmente, se añadieron 0,85 ml de la misma solución y se mezcló cuidadosamente. Se dejó la mezcla a temperatura ambiente durante 25 minutos, se centrifugó a 2500 g durante 15 minutos y se resuspendió el granulado en 2 ml de 1,2 M de sorbitol. Tras más de una sedimentación, los protoplastos se extienden en las placas adecuadas. Los protoplastos se extienden en placas mínimas (Cove, Biochem. Biophys. Act 1966 113 51-56) conteniendo 1,0 M de sucrosa, pH 7.0, 10 mM de acetainida como fuente de nitrógeno y 20 mM de CsCl para inhibir el crecimiento residual. Tras incubarlo durante 4-7 días a 37°C se recogieron las esporas y se extendieron para hallar las colonias únicas. Se repitió este procedimiento y se almacenaron las esporas de una única colonia tras el segundo reaislamiento a modo de transformante definido.

ES 2 169 219 T5

Ensayo de transformantes de Aspergillus oryzae

Se inoculó cada uno de los transformantes en 10 ml de YPM (ver abajo) y se propagó. Tras 2-5 días de incubación a 30°C, se eliminó el sobrenadante. Se identificó la actividad xilanolítica aplicando 10 µl de sobrenadante a agujeros con un diámetro de 4 mm practicados en placas de agar que contenían un 0,2% de xilano de abedul AZCL™ (Megazyme™, Australia). A continuación, se identificó la actividad xilanolítica como un halo de color azul.

Condiciones de hibridación

Las condiciones de hibridación adecuadas para determinar la hibridación entre una muestra oligonucleótida y una secuencia de ADN “análoga” según la invención se puede definir en el modo descrito a continuación. Una muestra oligonucleótida adecuada para ser usada en la hibridación se puede preparar en base a la parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN que se muestra en la ID de SEC N°: 1, o cualquier subsecuencia derivada, o en base a la secuencia amino deducida que se muestra en la ID de SEC N°: 2. Un ejemplo de muestra adecuada es la secuencia de ADN que se corresponde a la parte que codifica la xilanasas de la ID de SEC: 1, es decir, nucleótidos en las posiciones 31-705 en la ID de SEC N°: 1.

Previamente se puso a remojo un filtro conteniendo los fragmentos de ADN a hibridar en 5x SSC y se prehibridó durante 1 hora a aproximadamente 50°C en una solución de SxSSC, solución Sx Denhardt, 50 mM de fosfato sódico, pH 6.8, y 50 µg de ADN de timo de ternero sometido a un baño de ultrasonido desnaturalizado. Tras la hibridación durante 18 horas a ~45°C en la misma solución completada con 50 µ de la muestra marcada Ci 32-P-dCTP, se lava el producto tres veces en 2x SSC, 0,2% de SDS, durante 30 minutos a una temperatura de preferiblemente como mínimo 55°C en particular de como mínimo de 60°C, al menos de 65°C, aunque se prefiere que sea como mínimo de 70°C, como mínimo de 75°C, preferiblemente como mínimo de 80°C.

Las moléculas a las que bajo estas condiciones se hibridiza la sonda oligonucleótida pueden detectarse mediante una película de rayos X.

Medios

Medios YPM: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 810 ml de H₂O. Se añaden 90 ml de maltodextrina al 20%, se somete al autoclave y a un filtrado estéril.

Medios YPD: 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 810 ml de H₂O. Se añaden 90 ml de glucosa al 20% y se somete al autoclave y a un filtrado estéril.

10 x Medios de sal basal: 66,8 g de base de nitrógeno de levadura, 100 g de ácido succínico, 60 g de NaOH, H₂O hasta 1000 ml, filtrado estéril.

SC-URA: 90 ml de 10 x sal basal, 22,5 ml de ácidos de casamino al 20%, 9 ml de triptófano al 1%, H₂O hasta 806 ml, sometido a autoclave, 3,6 ml de treonina al 5% y 90 ml de glucosa al 20% o galactosa añadida al 20%.

Caldo SC-H: 7,5 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 11,3 g/l de ácido succínico, 6,8 g/l de NaOH, 5,6 g/l de ácidos de casamino sin vitaminas, 0,1 g/l de triptófano. Sometido a autoclave durante 20 minutos a 121°C. Tras el autoclave, se añadieron 10 ml de una solución de galactosa al 30%, 5 ml de una solución de glucosa al 30%) y 0,4 ml de una solución de treonina al 5% por 100 ml de medio.

Agar SC-H: 7,5 g/l de base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos, 11,3 g/l de ácido succínico, 6,8 g/l de NaOH, 5,6 g/l de ácidos de casamino sin vitaminas, 0,1 g/l de triptófano y 20 g/l de agar (Bacto™). Sometido a autoclave durante 20 minutos a 121°C. Tras el autoclave, se añadieron 55 ml de una solución de galactosa al 22% y 1,8 ml de una solución de treonina al 5% por 450 ml de agar.

Agar YNB-1: 3,3 g/l de KH₂PO₄, 16,7 g/l de agar, pH ajustado a 7 Sometido a autoclave durante 20 minutos a 121°C. Tras el autoclave, se añadieron 25 ml de una base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos al 13,6%, 25 ml de una solución de glucosa al 40%, 1,5 ml de una solución de L-leucina al 1% y 1,5 ml de una solución de histidina al 1% por 450 ml de agar.

Caldo YNB-1: Composición como la del agar YNB-1 pero sin agar.

Actividad xilanolítica

La actividad xilanolítica se puede expresar en unidades FXU, determinadas a un pH 6.0 con remazolxilano (4-O-metil-D-glucurono-D-xilano tintado con Azul Brillante de Remazol R, Fluka) como sustrato.

ES 2 169 219 T5

Se incubó una muestra de xilanasas con el sustrato de remazol-xilano. El residuo del sustrato tintado no degradado se precipita con etanol. El color azul que permanece en el sobrenadante (en el modo determinado por espectrofotometría a 585 nm) es proporcional a la actividad de la xilanasas y, a continuación, se determinan las unidades de xilanasas en relación a una enzima estándar a condiciones de reacción estándares es decir, a 50,0°C, pH 6.0 y un tiempo de reacción de 30 minutos.

Se puede conseguir el expediente AF 293.6/1 que describe con más detalle este método analítico pidiéndolo a Novo Nordisk NS, Dinamarca, cuyo expediente se incorpora aquí como referencia.

10 Ejemplo 1

Aislamiento del Gen

15 Se construyó una biblioteca de *Thermomyces lanuginosus* compuesta aproximadamente por 1,5 x 10⁶ clones individuales en 150 agregados. Se aisló el ADN de 20 clones individuales de dicha biblioteca y se sometió a análisis para insertar el ADNc. Se halló que la frecuencia de inserción era >90% y que el tamaño medio del inserto era de aproximadamente 1400 bp.

20 El ADN de algunos agregados se transformó en levadura y se obtuvo de cada agregado 50-100 placas que contenían 200-500 colonias de levadura. Tras 3-5 días de crecimiento, las placas de agar se replicaron con placas en diferentes conjuntos de placas de agar. A continuación, se incubó un conjunto de placas que contenía xilano AZCL™ al 0,1% (Megazyme™, Australia) durante 3-5 días a 30°C para detectar la actividad de la xilanasas. Se identificó las colonias positivas como colonias rodeadas por un halo azul. De forma alternativa, a continuación, se incubó un conjunto de 25 placas durante 3-5 días a 30°C antes de cubrir con una capa de xilano un gel que contenía xilano AZCL™ al 0,1% y un 1% de agarosa en un tampón con un pH adecuado. Tras la incubación durante 1-2 días a 30°C, se identificaron las colonias positivas como aquellas rodeadas por un halo azul.

30 Las células de colonias positivas de enzimas se extendieron para conseguir un único aislamiento de la colonia en agar y se seleccionó la única colonia productora de enzimas para cada una de las colonias productoras de xilanasas identificadas.

Caracterización de los Clones Positivos

35 Los clones positivos se obtuvieron como únicas colonias. Se amplificaron los insertos de ADNc directamente a partir de la colonia de levadura empleando cebadores del polienlace marcado con bintina, se purificaron mediante un sistema de bolitas magnéticas (Dynabead™ M-280, Dynal) y se caracterizaron individualmente secuenciando el extremo 5' de cada clon de ADNc mediante el método de terminación de cadena (Sanger F, Nicklen S & Coulson A R; Proc. Natl. Acad. Sci., USA 1977 74 5463-5467) y el sistema Sequenase™ (United States Biochemical).

40 La secuencia de ADN se muestra como ID de SEC N°: 1, que se corresponde con la secuencia de aminoácidos presentada como ID de SEC N°: 2.

Aislamiento del ADN de Levadura

45 Con el objetivo de evitar los errores de la RCP en el gen a donar, se aisló el ADNc de los plásmidos de levadura mediante procedimientos estándares, por ej., como los descritos en el ejemplo 1 de la WO 93/11249, cuya publicación se incorpora aquí como referencia. Se disolvió el ADN de la levadura en 50 µl de agua a una concentración final de aproximadamente 100 µl/ml.

50 Se transformó el ADN en *Escherichia coli* mediante procedimientos estándares. Se aislaron dos colonias de *E. coli* de cada una de las transformaciones y se analizaron con las enzimas de restricción HindIII y XbaI que escindieron el inserto de ADN. El ADN de uno de estos clones se volvió a transformar en la cepa de levadura JG169.

55 Se determinó parcialmente las secuencias de ADN de varios de los clones positivos. Las secuencias de ADN de la xilanasas según la invención se muestran como ID de SEC N°: 1, que se corresponde con la secuencia de aminoácidos presentada como ID de SEC N°: 2

60 Ejemplo 2

Expresión en Aspergillus

65 Con el objetivo de expresar el gen en *Aspergillus*, se aisló el ADNc de uno de los clones indicados anteriormente mediante digestión con HindIII/XbaI u otras enzimas de restricción apropiadas, el fraccionamiento del tamaño sobre un gel y la purificación y, posteriormente, la ligación en pHD414, cosa que tiene como resultado el plásmido pA2XITI. Tras la amplificación en *E. coli*, el plásmido se transformó en una cepa de *Aspergillus oryzae* según el procedimiento general descrito en la sección de Materiales y Métodos, arriba.

ES 2 169 219 T5

*Ensayo de transformantes de *Aspergillus oryzae**

Se inoculó cada uno de los transformantes en 10 ml de medio YPM. Tras 3-5 días de incubación a 30°C y 250 rpm, se eliminó el sobrenadante. La actividad xilanolítica se determinó aplicando 10 µl de sobrenadante en agujeros de 4 mm (de diámetro) practicados en una placa de agar que contenía xilano AZCL™ al 0,2% (Megazyme™, Australia) en un tampón con un pH apropiado y se incubó durante toda la noche a 40°C. La actividad de la xilanasa se identificó en el modo descrito anteriormente. Algunos transformantes presentaron halos significativamente más grandes que los del residuo de *Aspergillus oryzae*. Esto demuestra la expresión eficaz de la xilanasa en el *Aspergillus oryzae*. Se seleccionaron los 8 transformantes con la máxima actividad de xilanasa y se inocularon y mantuvieron en agar YPG.

Se inoculó cada uno de los 8 transformantes seleccionados desde los sesgos de agar YPC en un frasco de agitación de 500 ml con medios FG-4 y MDU-2. Tras 3-5 días de fermentación mientras se removía lo suficiente como para garantizar una buena aireación, se centrifugaron los caldos de cultivo durante 10 minutos a 2000 g y se analizaron los sobrenadantes.

Se aplicó un volumen de 15 µl de cada sobrenadante a agujeros con un diámetro 4 mm practicados en un 0,1% de gel de cubierta de xilano AZCL™ (25 ml en una placa petri de 13 cm de diámetro). Se identificó la actividad de la xilanasa debido a la formación de un halo azul durante la incubación.

Posteriormente, la xilanasa se fermentó en un medio que incluía maltodextrina como fuente de carbono, urea como fuente de nitrógeno y extracto de levadura. La fermentación se llevó a cabo inoculando un cultivo de un frasco de agitación de las células huésped de *Aspergillus oryzae* en un medio que incluía un 3,5% de la fuente de carbono y un 0,5% de la fuente de nitrógeno. Tras 24 horas de cultivo a pH 5.0 y 34°C se inició el suministro continuo de fuentes de nitrógeno y carbono adicionales. Se mantuvo la fuente de carbono como factor de limitación y se garantizó que el oxígeno estuviera presente en exceso. Se continuó el cultivo durante 4 días, tras lo que se pudo recuperar las enzimas centrifugándolas, ultrafiltrándolas, filtrándolas en claro y filtrando el germen.

Ejemplo 3

Ejemplo de Purificación

Se centrifugó el sobrenadante del cultivo derivado de la fermentación del *Aspergillus oryzae*, descrito en el ejemplo 2, que expresaba la enzima recombinante y se filtró a través de un filtro de 0,2 µm para eliminar los micelios.

Se ultra filtraron 100 ml de sobrenadante filtrado en un dispositivo de ultrafiltración Filtron™ ultracette o Amicon™ con una membrana de 3 kDa para dar como resultado una concentración de 10 veces. Se diluyó este concentrado 100 veces en 20 mM de Tris, pH 8.0, en dos ciclos sucesivos de ultrafiltración en el mismo dispositivo. Se cargó esta muestra de ultrafiltración en 2 ml/mm en un intercambiador aniónico de Q Sefarosa™ de flujo rápido Pharmacia XK 26/20 y se equilibró en 20 mM de Tris, pH 8.0.

Una vez se aplicó la muestra, se lavó la columna con dos volúmenes de columna con 25 mM de Tris, pH 8.0, y se eluyeron las proteínas enlazadas con un gradiente de NaCl en progresión lineal de 0 a 0,5 M de NaCl en 25 mM de Tris, pH 8.0. Se recogieron las fracciones y se midió la actividad de la xilanasa en las fracciones en el modo descrito anteriormente.

Las fracciones que contenían la xilanasa se agruparon y se concentraron en UF en 10 mM de citrato sódico, pH 4.0. Se cargó este material en una columna de S Sefarosa™ de flujo rápido XK 16/20 a 1,5 ml/mm. Se eluyó la enzima con un gradiente lineal de 0 a 0,4 M de NaCl y se agrupó, concentró y empleó las fracciones que contenían la xilanasa para caracterizarla y seguir experimentando en el modo descrito a continuación.

Ejemplo 4

Caracterización de Enzimas

Se sometió la xilanasa obtenida según el Ejemplo 3 a la siguiente caracterización de enzimas.

Electroforesis del sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacrimida

Se llevó a cabo el sistema de dilución simple por electroforesis en gel de poliacrimida (sulfato de sodio dodecilo/electroforesis en gel de poliacrilamida) en una unidad de electroforesis Mini-Leak 4 (Kern-En -Tec, Copenhagen) como versión modificada del procedimiento Laemmli (Laemmli UK; Nature 1970 227, 680-685; Christgau *et al.*, 1991, J. Biol. Chem. 1991 266 págs. 21157-212664).

Se determinó un peso molecular (PM) de aproximadamente 26 kDa.

ES 2 169 219 T5

Isoelectroenfoque

Se llevó a cabo el isoelectroenfoque en placas de gel de poliacrimida Ampholine™, pH 3.5-9.5 (Pharmacia, Suecia) en una unidad de electroforesis Multiphor™ según las instrucciones de los fabricantes. Tras la electroforesis, se manchó el gel con commassie según los protocolos estándares conocidos en la técnica.

Se determinó un punto isoelectro (pi) de aproximadamente 4.5.

10 pH y Temperatura Óptimos

Las actividades enzimáticas se midieron según la liberación de color azul de xilano de abedul AZCL™ (Megazyme™, Australia).

15 Se mezclaron 0,5 ml de suspensión de sustrato de AZCL™ al 0,4% con 0,5 ml de 0,1 M tampón citrato/fosfato con un pH óptimo y se añadieron 10 µl de una solución enzimática diluida de forma idónea. Las incubaciones se llevaron a cabo en termomezcladores Eppendorph durante 15 minutos a 30°C, seguido de la inactivación térmica durante 20 minutos a 95°C. Las incubaciones de la enzima se llevaron a cabo por triplicado. Se creó una muestra para ensayo en blanco en la que se añadió la enzima, aunque se inactivó inmediatamente. Tras el centrifugado, se midió la absorbencia del sobrenadante en placas de microtitulación a 620 nm y se substrajo la mezcla.

20 Se emplearon 0,1 M de tampones de citrato/fosfato con un pH variable para determinar el pH óptimo. Se utilizó un tampón de 0,1 M de citrato/fosfato, pH 5.5, incubándolo a temperaturas diferentes durante 15 minutos para determinar la temperatura óptima. Los resultados aparecen presentados en las Figs. 1-2.

25 La Figura 1 muestra la actividad xilanólítica relativa (%) determinada a 30°C con un margen de pH entre 2.5 y 9. Parece que la enzima presenta un pH óptimo en el margen de 4.5-7.5, más específicamente el margen de entre 5.0-6.5, en torno a un pH 6.

30 La Figura 2 muestra la actividad xilanólítica relativa (%) determinada a un pH 5.5 en un margen de entre 30 y 80°C. Parece que la enzima presenta una temperatura óptima en el margen de entre 50-70°C, en torno a los 60°C.

35 Ejemplo 5

Comparaciones de Termoestabilidad

En este ejemplo, se comparó la termoestabilidad de una preparación con xilanasas de un único componente obtenida según los ejemplos 1-3 con la preparación con xilanasas *Thermomyces lanuginosus* nativa.

La xilanasas nativa *Thermomyces lanuginosus* se preparó en el modo descrito a continuación.

45 Se inoculó la cepa *Thermomyces lanuginosus* DSM 4109 durante 24 horas en 200 litros de medio YPG con la siguiente composición (g/l):

Extracto de levadura, 50 %	10
Glucosa	5
KH ₂ PO ₄	3
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	2
FeSO ₄	0,25
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2
Pluronic	0,7
pH ajustado a 6.0	

65

ES 2 169 219 T5

Tras la inoculación, al inoculo se le añadieron 2000 litros del siguiente medio (g/l) y se fermentó durante 3 días más:

5	Caseinato sódico	10
	Harina de soja	20
10	Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O	20
	Xilano	3
	Xilosa	500
15	pH ajustado a 7.5	

Se eliminaron las células centrifugándolas, se concentró el sobrenadante por ultrafiltración (usando una membrana de corte de 10,000 MW) y se convirtió el concentrado UF en un polvo en bruto mediante liofilización.

Las preparaciones se diluyeron con 100 mM de tampón de citrato-fosfato, pH 6.0 con el objetivo de trasladar la actividad enzimática dentro de un margen analítico lineal en aquellos casos en los que se aplica al ensayo sobre actividad enzimática descrito a continuación. Las muestras diluidas se colocaron en un baño de agua en partes alícuotas de 2 ml a temperaturas de 60, 65, 70 y 75°C. Se mantuvo la muestra de control en agua helada. Se extrajeron las muestras incubadas después de 60 y se colocaron en agua helada.

Se empleó un sustrato de remazol-xilano de madera de haya (4-O-metil-D-glucurono-D-xilano tintado con Azul R Brillante de Remazol, Fluka). Se disolvió el sustrato para crear una solución al 0,5% (p/v) con 100 mM de tampón de citrato-fosfato, pH 6.0.

Para determinar las actividades enzimáticas residuales se añadieron 0,9 ml de sustrato a cuatro tubos (dos valores principales y dos muestras para ensayo en blanco) y se precalentó en un baño de agua a 50°C durante 5 minutos. A t=0, se añadieron 0,1 ml de muestra enzimática a todos los tubos que constituían los valores principales y se mezclaron. Tras 60 minutos, se terminó la incubación añadiendo 5 ml de reactivo con etanol (una mezcla de 150 ml de etanol al 99,9% y 1 ml de 2 N de HCl), tras lo que se removió durante 10 segundos en un Whirlimixer. A todos los tubos que constituían muestras de ensayos en blanco se les añadió, en primer lugar, 5 ml de reactivo con etanol, tras lo que se añadieron 0,1 ml de muestra enzimática y se removió todo durante 10 segundos en un Whirlimixer. Se dejó que todos los tubos permanecieran durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente antes de centrifugarlos a 4.000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se midió la densidad óptica a 585 nm, se sacó la media de las determinaciones dobles y se sustrajeron las muestras para ensayo en blanco.

Se determinó la actividad enzimática residual relativa como función de temperatura de incubación y se calculó el tiempo como porcentaje del valor de control (valor de control definido como "100%"). Los resultados aparecen presentados en la Fig. 3.

En dicha figura se representa la actividad residual de la preparación con xilanasa de un único componente según la invención (barras blancas) en comparación con la de la preparación con xilanasa nativa *Thermomyces lanuginosus* (barras a rayas). También se muestra la actividad residual determinada a un pH 6.0 y tras la incubación a 60, 65, 70 y 75°C durante 30 y 60 minutos, respectivamente.

A partir de dicha figura se puede observar que el componente de xilanasa según la invención presenta una actividad enzimática residual tras la incubación durante 60 minutos con un pH 6.0 y 60°C superior al 96%, más específicamente superior al 97%, esencialmente de un 100%.

Tras la incubación durante 60 minutos a un pH 6.0 y 65°C, el componente de xilanasa según la invención presenta una actividad enzimática residual superior al 83%, en particular superior al 85%, con más detalle superior al 90%, esencialmente de un 100%.

Tras la incubación durante 60 minutos a pH 6.0 y 70°C, el componente de la xilanasa según la invención presenta una actividad enzimática residual superior al 20%, en particular superior al 30%, con más detalle superior al 40%, aún con más detalle superior al 50%, en torno a un 63%.

Tras la incubación durante 60 minutos a pH 6.0 y 75°C, el componente de la xilanasa según la invención presenta una actividad enzimática residual superior al 9%, en particular superior al 10%, con más detalle superior al 20%, aún con más detalle superior al 30%, en torno al 48%.

A partir de la figura también se puede observar que la preparación con xilanasa de un único componente según la invención muestra una termoestabilidad significativamente perfeccionada en comparación con la preparación con

ES 2 169 219 T5

xilanasa nativa *Thermomyces lanuginosus*. Además de ser una enzima mejoradora de alimentos excelente, esta mejora inesperada en la termoestabilidad hace posible que la preparación con xilanasa de un único componente según la invención resulte particularmente muy adecuada para su incorporación en aditivos alimenticios para animales. Durante la incorporación en dichos aditivos alimenticios para animales, la termoestabilidad de la enzima juega un papel importante a la hora de prevenir las infecciones microbianas en los piensos.

Ejemplo 6

10 Reducción de la Viscosidad *in Vitro*

Se ha identificado la viscosidad de la digesta del intestino anterior como constricción nutritiva principal que influye sobre la digestibilidad de las dietas de engorde basadas en trigo y cebada. También se ha hallado una correlación más cercana entre los resultados de la reducción de la viscosidad de la digesta y las mejoras en la eficacia de la conversión de comida para pollos [ver, p. ej., Graham H, Bedford M y Choct M; Feedstuffs 1993 65 (5) 14-15].

En este experimento, se somete a examen la reducción en la viscosidad del trigo obtenida al emplear (i) una preparación con xilanasa *Thermomyces lanuginosus* de un único componente producida por recombinación obtenida según los ejemplos 1-3, (ii) una preparación con xilanasa nativa de *Thermomyces lanuginosus* obtenida mediante un cultivo en el modo descrito en el ejemplo 5, y (iii) una preparación enzimática de varios componentes comercialmente disponible obtenida mediante un cultivo de *Humicola insolens* (Bio-Feed Plus CT, producto de Novo Nordisk A/S, Dinamarca), respectivamente.

A t=0, se mezclaron 12 g de trigo seco molido ("Statens Husdyrbrugsforsøg", Foulum, Dinamarca), tamiz de maya de 1 mm, con 38 ml de tampón de extracción, 0.5 M de HCl-KCl, pH 1,5, y se mantuvo a 40°C mientras se removía de forma constante. Durante la incubación, se cubrieron las muestras con papel de estaño. A t=89 minutos, se ajustó el pH a 6.0 (\pm 0.15) con 1 M de NaOH. A t=90 minutos, se añadió una solución enzimática a un total de 40 ml.

Se diluyeron las preparaciones enzimáticas anteriormente mencionadas (i)-(iii) para dar como resultado una concentración enzimática final en el margen de entre 0,16 y 5,19 FXU/g de trigo. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y siempre se incluyeron las muestras, es decir, las soluciones sin enzima añadida, por duplicado.

Tras 30 minutos de incubación, se extrajeron las muestras para determinar la viscosidad. Se empleó un viscosímetro Brookfield LVDV-III con un adaptador de muestras pequeño y un huso N° SC4-31, a 250 rpm correspondientes a una velocidad de cizallamiento de 85 s⁻¹. Para cada determinación, se vertieron rápidamente aproximadamente 13 ml de suspensión en el adaptador de muestras pequeño, que posteriormente se situó en la cámara de agua mientras se calentaba de manera constante a 40°C. Se llevaron a cabo tres lecturas cP separadas, cada una por cada 15 segundos, y se empleó el valor medio.

En cualquier caso, los datos resultantes obtenidos con la enzima añadida se expresaron como viscosidad relativa, es decir, relativa a la viscosidad medida en las muestras de control, definidas como "1".

En la Fig. 4 se muestran los resultados de la comparación entre la eficiencia de la reducción de la viscosidad del trigo entre (ii) la xilanasa nativa *Thermomyces lanuginosus*, en dosis de 0,16, 0,32, 0,65, 1,29 y 2,58 FXU/g de trigo (●) y (iii) una preparación enzimática de varios componentes obtenida al cultivar *Humicola insolens*, en dosis de 0,32, 0,65, 1,29, 2,58 y 5,19 FXU/g de trigo (X). A partir de dicha figura se puede observar que en comparación con (iii), una preparación enzimática de varios componentes obtenida al cultivar *Humicola insolens*, la xilanasa nativa *Thermomyces lanuginosus* (ii), reduce significativamente la viscosidad de una suspensión con trigo al calcularla sobre una base FXU.

Además, en la Fig. 5 se muestran los resultados de una comparación en la eficiencia de la reducción de la viscosidad del trigo entre (i) la xilanasa *Thermomyces lanuginosus* de un único componente producida por recombinación (I) y (ii) la xilanasa nativa *Thermomyces lanuginosus* (II). Los resultados se basan en dos dosificaciones similares de 0,65 y 2,58 FXU/g de trigo. A partir de esta figura se puede observar que el efecto sobre la viscosidad en suspensiones con trigo es bastante similar.

En resumen, este ejemplo demuestra claramente que cuando se comparan con un aditivo alimenticio según la técnica precedente, las xilanasas derivadas de *Thermomyces lanuginosus* son superiores a la hora de reducir la viscosidad de una suspensión con trigo y, en consecuencia, poseen un gran potencial para su uso como enzimas mejoradoras de alimentos.

Ejemplo 7

Xilanasa *Thermomyces lanuginosus* como Enzima Mejoradora de Alimentos

En este ejemplo, se añade una xilanasa de un único componente *Thermomyces lanuginosus* al alimento para animales y se compara con una preparación enzimática que incremente la digestibilidad convencional.

ES 2 169 219 T5

La preparación con xilanasa de un único componente se obtuvo según los ejemplos 1-3. La preparación de referencia es un aditivo alimenticio según la técnica precedente, una preparación enzimática de varios componentes obtenida cultivando la *Humicola insolens* (Bio-Feed Plus CT, producto de Novo Nordisk NS, Dinamarca).

5 Se alimentaron pollos de engorde con una dieta experimental con y sin enzimas durante tres semanas. La composición de la dieta se muestra en la Tabla 1, abajo.

Se dividieron los animales en cinco grupos principales y se los sometió a cinco tratamientos diferentes. Se dividió cada grupo principal en ocho subgrupos (jaulas) compuestos por 30 pollos de engorde (15 de cada sexo). Se pesó por separado cada subgrupo (jaula).

Los cinco tratamientos diferentes incluían un tratamiento de control sin enzimas, así como los siguientes tratamientos con aditivos enzimáticos: 400 y 800 FXU/kg de alimento de preparación de referencia (Ref.) y 200 y 400 FXU/kg de alimento de preparación con xilanasa de un único componente según la invención (Inv.).

TABLA 1

Composición del alimento	
Ingredientes	%
Trigo, descascarado, tostado	73,10
Comida para peces, baja en cenizas	12,50
Harina de carne y huesos, baja en cenizas	4,00
Grasa animal	4,00
Metionina (40 %)	4,00
Carbonato cálcico	0,45
Fosfato dicálcico	0,60
Mezcla previa de vitaminas/microminerales	0,75
Cloruro de Colina	0,26
	0,04
Total	100
ME por kg de alimento, MJ	12,85
Proteína, %	19,77
Por 10 MJME, g	
Proteína	154
Lisina	7,26
Treonina	5,17
Metionina + cistina	6,31
Arginina	8,77
Calcio	7,27
Fósforo, disponible	3,48
Sodio	1,53
Cloruro	2,21

ES 2 169 219 T5

Se inició el tratamiento en polluelos de varios días de edad. Tras tres semanas de tratamiento, se midió el aumento de peso y el consumo de alimentos y se calculó un ratio de conversión de alimentos (RCA), ver Tabla 2, abajo (en la que se representa el peso del polluelo y la toma de alimentos a la edad de tres semanas).

5 A partir de la Tabla 2 se puede observar que RCA es inferior en los grupos receptor de 200 FXLT/kg de alimento de la preparación enzimática según la invención (Inv.) en comparación con el grupo de control y el grupo receptor de 400 FXU de la preparación de referencia (Ref.). Sin embargo, el RCA calculado tras emplear 200 FXU de la preparación enzimática según la invención se encuentra al mismo nivel que tras emplear 800 FXU de la preparación de referencia, cosa que indica que en comparación con la preparación de referencia, la preparación enzimática según la invención
10 presenta el mismo efecto que un nivel de dosis de 1/4 FXU.

15 En consecuencia, se considera que la enzima según la invención ayuda más a mejorar la digestibilidad de los piensos que la preparación de referencia. A pesar de que es una preparación de un único componente, la preparación según la invención es superior a la hora de incrementar la digestibilidad si se compara con un aditivo alimenticio del estado de la técnica, que ofrece la acción de componentes enzimáticos múltiples.

TABLA 2

Parámetros de producción de 0 a 3 Semanas				
		Peso/Polluelo (g)	Toma de alimentos/Polluelo (g)	Ratio de Conversión de Alimentos (g/g)
	Control	612	870	1.42 100
	Ref. 400	587	839	1.42 100
	800	634	878	1.38 97
	Inv. 200	623	861	1.38 97
	400	597	820	1.37 96

Ejemplo 8

35 *Mejora de la Energía Metabolizable del Trigo en Dietas de Engorde*

Este ejemplo muestra una comparación de dos aditivos alimenticios para animales según la invención con un aditivo alimenticio según el estado de la técnica en el impacto sobre el valor de la Energía Metabolizable evidente (EME) del trigo.

Los dos aditivos alimenticios para animales según la invención son (A) una preparación con la xilanasas de un único componente *Thermomyces lanuginosus* obtenida mediante técnicas de ADN recombinante según los ejemplos 1-3, y (B) una preparación con la xilanasas nativa *Thermomyces lanuginosus* obtenida a través del método descrito en el ejemplo 5. El aditivo alimenticio según el estado de la técnica es una preparación enzimática de varios componentes (C) obtenida al cultivar *Humicola insolens* (Bio-Feed Plus CT, producto de Novo Nordisk NS, Dinamarca).

Se emplearon polluelos de engorde acelerado Ross de un día de edad, distribuidos por un criadero comercial. Se les alimentó con una dieta inicial comercial entre los días 1 a 16. El día 16 se les pesó individualmente. Se descartaron los pollos con un peso demasiado elevado o demasiado bajo y al resto se les asignó una jaula en batería. Entre el día 16 y el 23 se adaptaron a las jaulas.

Se llevó a cabo un ensayo de equilibrio entre los días 24 y 28 según el European Reference Method (Método de referencia europeo) para la determinación in vivo de energía metabolizable EME [Bourdillon *et al.*; Br. Pouly. Sci. 1990 31 557-565]. El ensayo incluyó 9 tratamientos con 5 replicados de 4 polluelos de engorde por replicado.

La dieta basal contenía un 56% de sorgo, 32,5% de harina de soja, 6 de grasa animal, 1% de aceite de soja y un 5% de minerales, vitaminas, oligoelementos y aminoácidos. En la dieta experimental, se reemplazó la mitad de la dieta basal por trigo. Se alimentaron los polluelos con dietas a modo de masa a un nivel de un 90% de toma *ad libitum*.

60 Cada día se recogieron los excrementos de forma cuantitativa. Se sometieron a análisis muestras de alimento y excrementos liofilizados para detectar la grasa, la energía bruta (EB) y el nitrógeno. El contenido en AME de la dieta se calculó a partir de su respectiva ratio excrementos/alimento así como a partir de su correspondiente contenido en EB. La corrección para la retención de N a cero (AMEN) se efectuó usando un equivalente de energía de 34,36 kJ/g N-retenido. Se determinó la digestibilidad de las grasas extrayendo las grasas de los excrementos derivados de las dietas y liofilizados, teniendo en cuenta el ratio excrementos/alimentos. Los resultados se analizaron mediante un análisis de un sólo factor de varianza con diferencias significantes identificadas mediante un test de alcance múltiple LSD, usando Statgraphics versión 5. Los resultados se muestran en la tabla 3, abajo, y en las Figs. 6-7.

ES 2 169 219 T5

La Figura 6 muestra el valor AMEn del trigo (MJ/kg) como función de adición de la xilanasas (FXU/kg de alimento); (A) preparación con la xilanasas de un único componente *Thermomyces lanuginosus*; (B) preparación con la xilanasas nativa *Thermomyces lanuginosus*; (C) referencia (Bio-Feed Plus CT, producto de Novo Nordisk A/S, Dinamarca; una preparación enzimática de varios componentes obtenida al cultivar *Humicola insolens*).

La Figura 7 muestra la digestión de grasa (%) en la dieta experimental en función de la adición de la xilanasas (FXU/kg de alimento); (A) preparación con la xilanasas de un único componente *Thermomyces lanuginosus*; (B) preparación con la xilanasas nativa *Thermomyces lanuginosus*; (C) referencia (Bio-Feed Plus CT, producto de Novo Nordisk A/S Dinamarca; una preparación enzimática de varios componentes obtenida al cultivar *Humicola insolens*).

La suplementación de la dieta basal con 200 FXU/kg de alimento de bien (A) o (B) tuvo como resultado un aumento relativamente pequeño y no significativo en el valor AMEn medio así como de la digestión de grasa (ver, Tabla 3). En consecuencia, no se llevó a cabo ninguna corrección sobre la actividad de las xilanasas sobre los componentes basales al calcular los valores AMEn del trigo.

En la dieta experimental tanto (A) como (B) se administraron en dosis de 100 y 200 FXU/kg de alimento, mientras que (C) se administró en dosis de 400 FXU/kg de alimento.

Como se puede observar a partir de la Tabla 3, ambas dosis de los aditivos alimenticios para animales según la invención tuvieron como resultado un AMEn significativamente mejor que la dieta experimental por sí sola. El AMEn del trigo muestra mejoras de un 4,9-8,6% tras haber añadido las enzimas. El aditivo de referencia (C) muestra una mejora sobre el AMEn del trigo de un 4,9%.

Al comparar los aditivos alimenticios para animales según la invención con un aditivo según el estado de la técnica, resulta evidente que los aditivos alimenticios para animales según la invención se comportan mucho mejor que el aditivo de referencia al administrarse en dosis basadas en FXU. 200 FXU/kg de (B) es significativamente mejor que las 400 FXU/kg de (C).

La digestión de grasa de la dieta experimental sigue las mismas pautas que los valores AMEn.

TABLA 3

Tratamiento	Dieta				Trigo	
	Dig. Grasa (%)	AME (MJ/kg)	N-Retención (kJ/kg)	AMEn (MJ/kg)	AMEn (MJ/kg)	Dif. (%)
Dieta Basal (D)	73.6 ab	13.14 ± 0.47 a	607 ± 6 a	12.53 ± 0.05 ab	-	-
D + (A) 200 FXU/kg	73.1 ab	13.19 ± 0.13 a	604 ± 7 a	12.59 ± 0.12 a	-	+ 0.66
D + (B) 200 FXU/kg	72.7 abc	13.15 ± 0.13 a	620 ± 20 a	12.53 ± 0.12 ab	-	+ 0.03
50% D + 50% trigo (DT)	69.1 ef	12.32 ± 0.15 d	427 ± 9 ef	11.89 ± 0.15 e	11.25	-
DT + (C) 400 FXU/kg	72.4 bcd	12.62 ± 0.25 c	455 ± 20 bcd	12.16 ± 0.24 d	11.80	+ 4.85
DT + (A) 100 FXU/kg	72.1 bcd	12.60 ± 0.07 c	441 ± 18 cde	12.16 ± 0.06 d	11.80	+ 4.89
DT + (A) 200 FXU/kg	73.5 ab	12.75 ± 0.17 bc	463 ± 12 b	12.29 ± 0.17 cd	12.05	+ 7.11
DT + (B) 100 FXU/kg	72.6 abc	12.64 ± 0.10 bc	437 ± 14 de	12.21 ± 0.09 cd	11.89	+ 5.65
DT + (B) 200 FXU/kg	74.3 a	12.84 ± 0.12 b	460 ± 14 bc	12.38 ± 0.11 bc	12.22	+ 8.64

Documentos citados en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante fue recopilada exclusivamente para la información del lector y no forma parte del documento de la patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Patentes citadas en la descripción

- US 4683202 A [0052]

ES 2 169 219 T5

• WO 9311249 A [0056] [0090] [0091] [0092] [0126]

• US 4599311 A [0065] [0077]

5 • WO 8605812 A [0069]

• US 4959316 A [0070]

• WO 9109129 A [0070]

10 • EP 283075 A [0070]

• US 4882279 A [0077]

15 • US 4931373 A [0077] [0077]

• US 4870008 A [0077]

• US 5037743 A [0077]

20 • US 4845075 A [0077]

• EP 272277 A [0078]

25 • EP 230023 A [0078]

• EP 238023 A [0078] [0090]

• WO 9414952 A [0095] [0102] [0102]

30 **Literatura que no son patentes citada en la descripción**

• **LISCHNIG T PURKARTHOFER H STEINER W** *Biotechnology Letters*, 1993, vol. 15, no. 4. 411-414 [0004]

35 • **GOMES J PURKARTHOFER H HAYN M KAPPLMÜLLER J SINNER M STEINER W** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1993, vol. 39, 700-707 [0004]

• **ALAM M GOMES I MOHIUDDIN G HOQ M M** *Enzyme Microb. Technol.*, 1994, vol. 16, 298-302 [0006]

40 • **BEDFORD et al.** *Proceedings of the 1st Symposium on Enzymes in Animal Nutrition*, 1993, 73-77 [0016]

• **FORD** *Protein Expression and Purification*, 1991, vol. 2, 95-107 [0029]

45 • **CUNNINGHAM WELLS** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0030]

• **VOS et al.** *Science*, 1992, vol. 255, 306-312 [0030]

• **SMITH et al.** *J. Mol. Biol.*, 1992, vol. 224, 899-904 [0030]

50 • **WLODAVER et al.** *FEBS Lett.*, 1992, vol. 309, 59-64 [0030]

• **NEEDLEMAN S B WUNSCH C D** *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443-453 [0032] [0035]

• **TORRONEN A et al.** *Biotechnology*, 1992, vol. 10, no. 11. 1461-1465 [0036]

55 • **APEL P C et al.** *Mol. Plant Microb. Interact.*, 1993, vol. 6, 467-473 [0036]

• **HENRISSAT B** *Biochem. J.*, 1991, vol. 280, 309-316 [0044]

60 • **BEAUCAGE CARUTHERS** *Tetrahedron Letters*, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0050]

• **MATTHES et al.** *EMBO Journal*, 1984, vol. 3, 801-805 [0050]

• **SAIKI et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0052]

65 • **HITZEMAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 12073-12080 [0065]

ES 2 169 219 T5

- ALBER KAWASAKI *J. Mol. Appl. Gen.*, 1982, vol. 1, 419-434 [0065]
- YOUNG *et al.* Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals Plenum Press 1982. [0065]
- 5 • RUSSELL *et al.* *Nature*, 1983, vol. 304, 652-654 [0065]
- MCKNIGHT *et al.* *The EMBO J.*, 1985, vol. 4, 2093-2099 [0066]
- RUSSELL P R *Gene*, 1985, vol. 40, 125-130 [0067]
- 10 • SAMBROOK *et al.* *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 1989, [0071]
- GLEESON *et al.* *J. Gen. Microbiol.*, 1986, vol. 132, 3459-3465 [0077]
- 15 • MALARDIER *et al.* *Gene*, 1989, vol. 78, 147-156 [0078]
- GUBLER U HOFFMAN B J *Gene*, 1983, vol. 25, 263-269 [0092]
- SAMBROOK *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Lab.* 1989. [0092]
- 20 • BECKER D M GUARANTE L, *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 194, 182-187 [0097]
- SANGER *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0100]
- 25 • SHERMAN *et al.* *Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory* 1981. [0103]
- COVE *Biochem. Biophys. Acta*, 1966, vol. 113, 51-56 [0105]
- SANGER F NICKLEN S COULSON A R *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1977, vol. 74, 5463-5467 [0124]
- 30 • LAEMMLI U K; *Nature*, 1970, vol. 227,, 680-685 [0139]
- CHRISTGAU *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 21157-212664 [0139]
- 35 • GRAHAM H BEDFORD M CHOCT M *Feedstuffs*, 1993, vol. 65, no. 5. 14-15 [0163]
- BOURDILLON *et al.* *Br. Pouly. Sci.*, 1990, vol. 31, 557-565 [0183]

40

45

50

55

60

65

ES 2 169 219 T5

REIVINDICACIONES

1. Aditivo alimenticio para animales que comprende una xilanasas, dicha xilanasas comprendiendo:

- 5 i) una secuencia de aminoácidos con una homología de, como mínimo, un 80% a la ID de SEC N° 2; o dicha xilanasas siendo codificada por un constructo de ADN que comprende
- ii) la secuencia de ADN de la ID de SEC N°: 1; o
- 10 iii) una parte que codifica la xilanasas de la ID de SEC N°: 1; o
- iv) los nucleótidos N° 31-705 de la ID de SEC N°: 1; o
- 15 v) una parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
- vi) una secuencia de ADN que difiere de las secuencias de ii)-v) debido a la degeneración del código genético; o
- 20 vii) una secuencia de ADN que es homóloga en, como mínimo, un 80% a cualquiera de las secuencias ii)-v) y **caracterizado** por el hecho de que el aditivo alimenticio para animales es provisto en forma de un granulado revestido o no revestido.

25 2. Aditivo alimenticio para animales según la reivindicación 1 en el que la homología mencionada en el párrafo i) según la reivindicación 1 es de al menos un 85%, o al menos un 90%, o o al menos un 95%; o en el que la homología mencionada en el párrafo vii) según la reivindicación 1 es de al menos un 85% o al menos de un 90% o de al menos el 95%.

30 3. Mezcla previa para alimentos para animales que comprende un aditivo alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

35 4. Alimento para animales que comprende componentes alimenticios para animales mezclados con una xilanasas, dicha xilanasas comprendiendo:

- i) una secuencia de aminoácidos con una homología de, como mínimo, un 80% a la ID de SEC N° 2; o dicha xilanasas siendo codificada por un constructo de ADN que comprende
- 40 ii) la secuencia de ADN de la ID de SEC N°: 1; o
- iii) una parte que codifica la xilanasas de la ID de SEC N°: 1; o
- iv) los nucleótidos N° 31-705 de la ID de SEC N°: 1; o
- 45 v) una parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o
- vi) una secuencia de ADN que difiere de las secuencias de ii)-v) debido a la degeneración del código genético; o vii) una secuencia de ADN que es homóloga en, como mínimo, un 80% a cualquiera de las secuencias ii)-v)
- 50

55 5. Proceso para preparar alimentos para animales en el que los componentes alimenticios se mezclan con el aditivo alimenticio para animales, que comprende una xilanasas, dicha xilanasas comprendiendo:

- i) una secuencia de aminoácidos con una homología de, como mínimo, un 80% a la ID de SEC N° 2; o dicha xilanasas siendo codificada por un constructo de ADN que comprende
- 60 ii) la secuencia de ADN de la ID de SEC N°: 1; o
- iii) una parte que codifica la xilanasas de la ID de SEC N°: 1; o
- 65 iv) los nucleótidos N° 31-705 de la ID de SEC N°: 1; o
- v) una parte que codifica la xilanasas de la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* DSM 10133; o

ES 2 169 219 T5

vi) una secuencia de ADN que difiere de las secuencias de ii)-v) debido a la degeneración del código genético;
o

vii) una secuencia de ADN que es homóloga en, como mínimo, un 80% a cualquiera de las secuencias ii)-v)
o la mezcla previa según la reivindicación 3

6. Uso de una xilanasa, dicha xilanasa comprendiendo:

i) una secuencia de aminoácidos con una homología de, como mínimo, un 80% a la ID de SEC N° 2;
o dicha xilanasa siendo codificada por un constructo de ADN que comprende

ii) la secuencia de ADN de la ID de SEC N°: 1; o

iii) una parte que codifica la xilanasa de la ID de SEC N°: 1; o

iv) los nucleótidos N° 31-705 de la ID de SEC N°: 1; o

v) una parte que codifica la xilanasa de la secuencia de ADN que se puede obtener del plásmido de la cepa
Saccharomyces cerevisiae DSM 10133; o

vi) una secuencia de ADN que difiere de las secuencias de ii)-v) debido a la degeneración del código genético;
o

vii) una secuencia de ADN que es homóloga en, como mínimo, un 80% a cualquiera de las secuencias ii)-v)
en alimentos, aditivos alimenticios o mezclas previas para animales; o para la modificación *in vitro* de componentes
alimenticios.

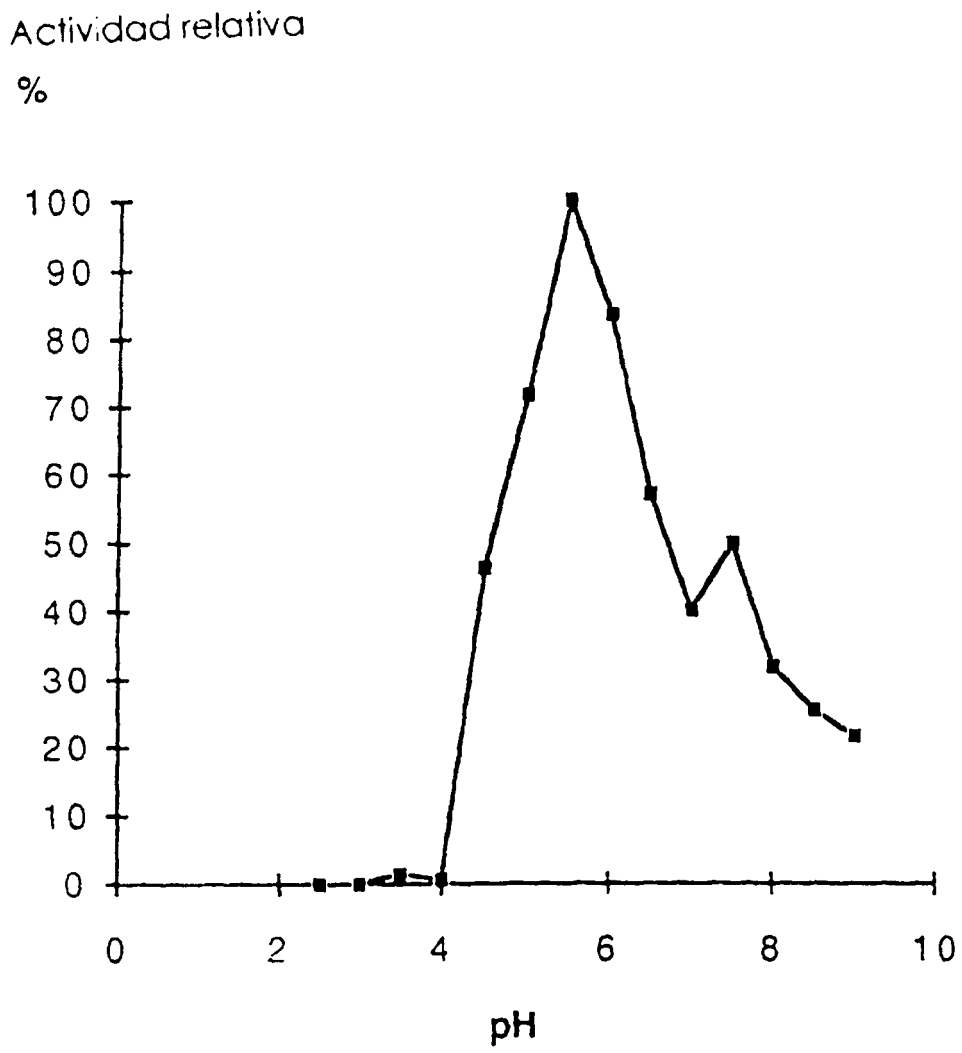


FIG. 1

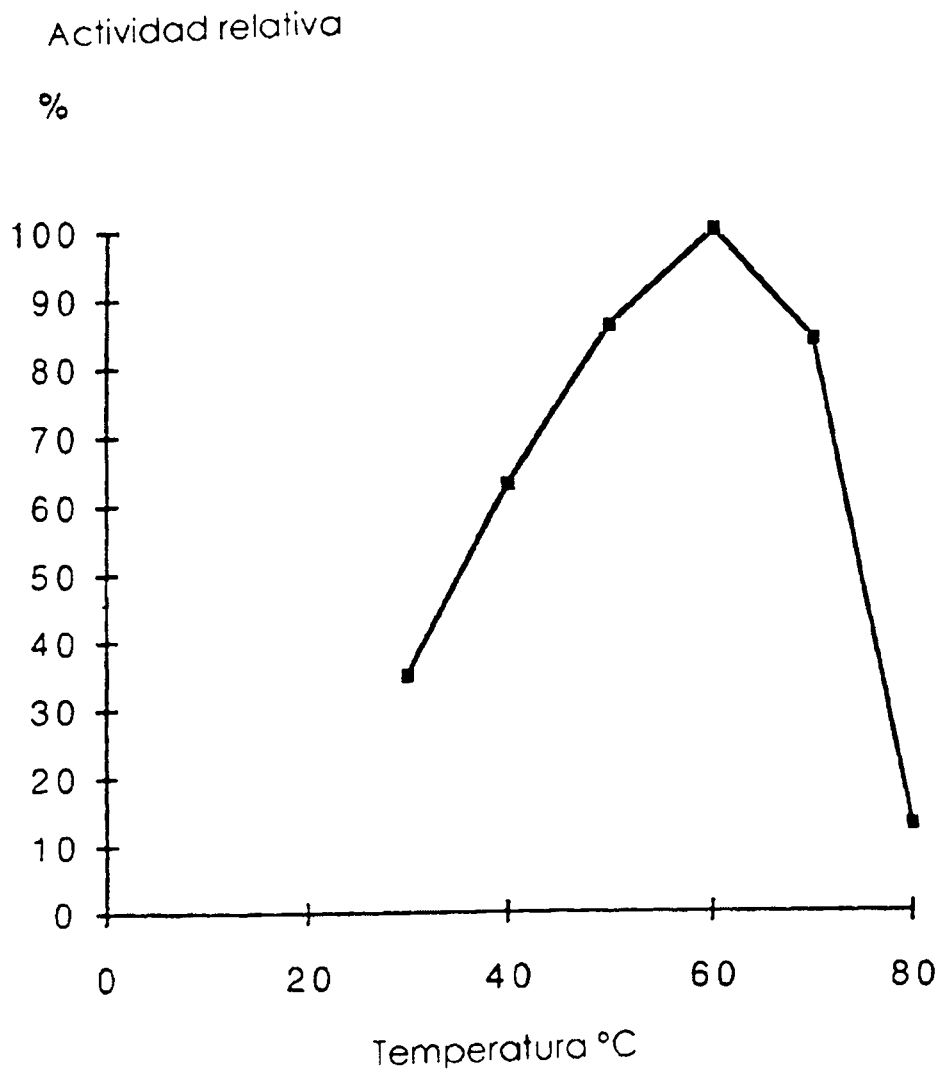


FIG. 2

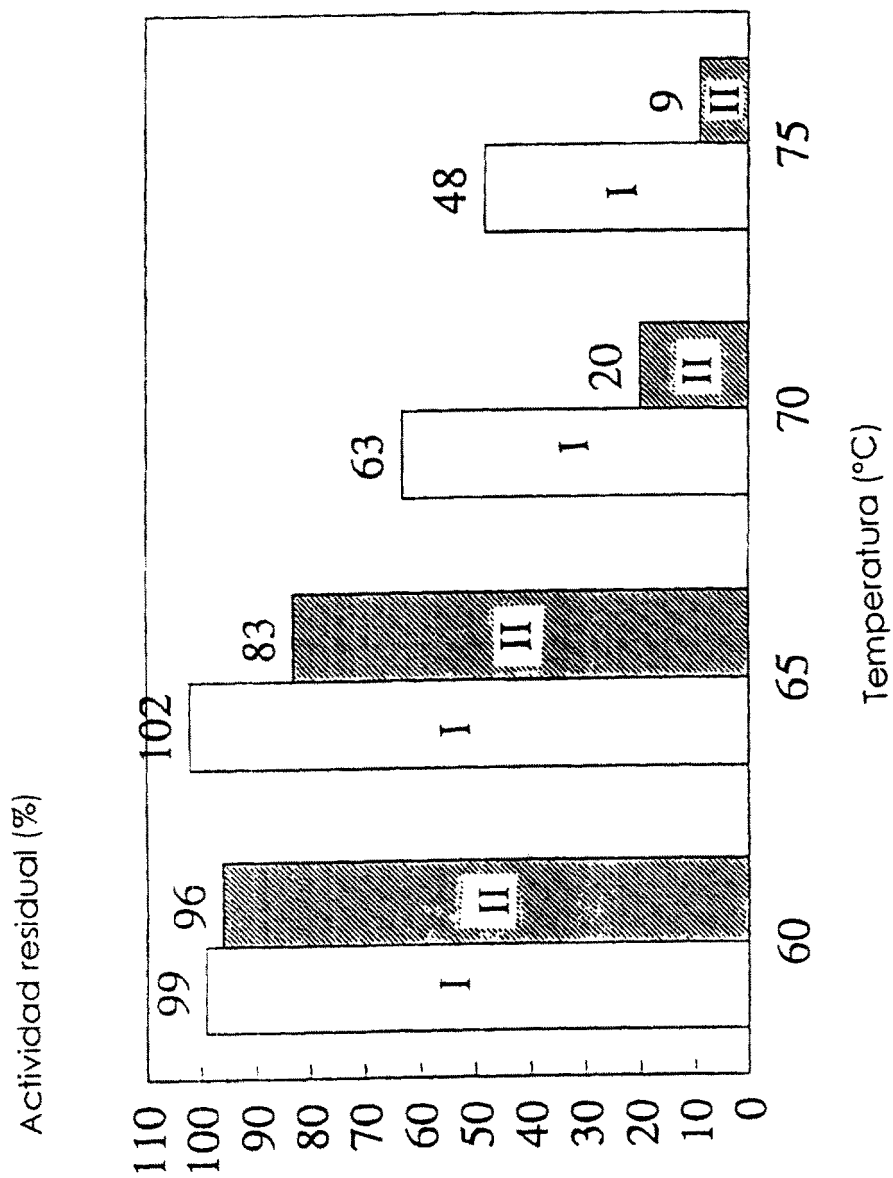


FIG. 3

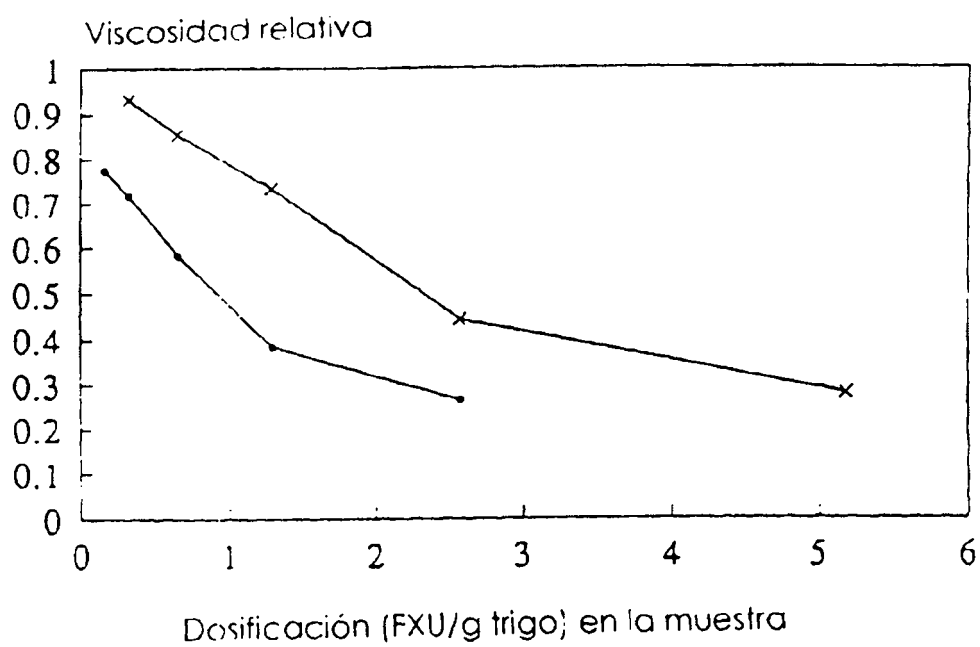


FIG. 4

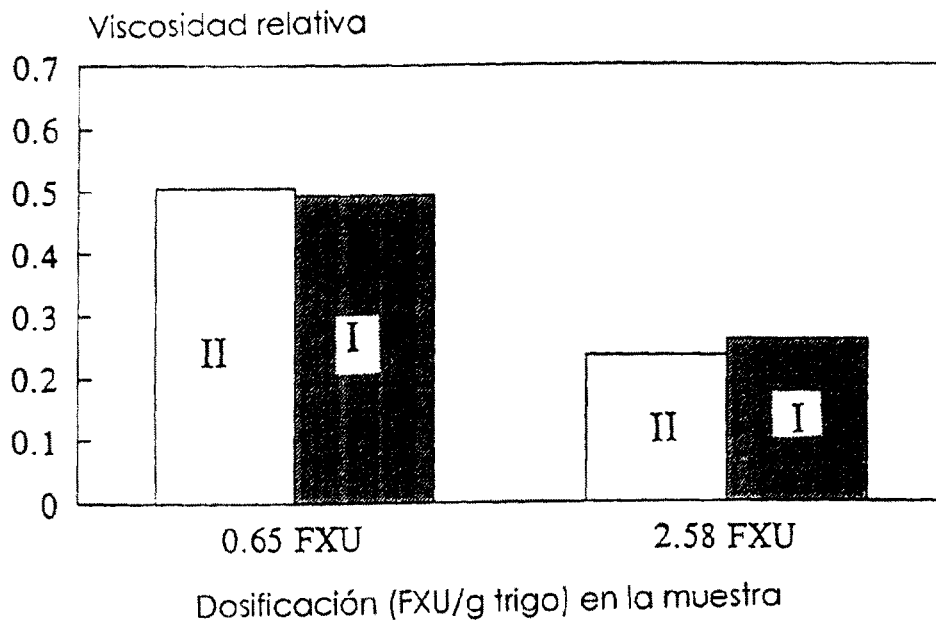


FIG. 5

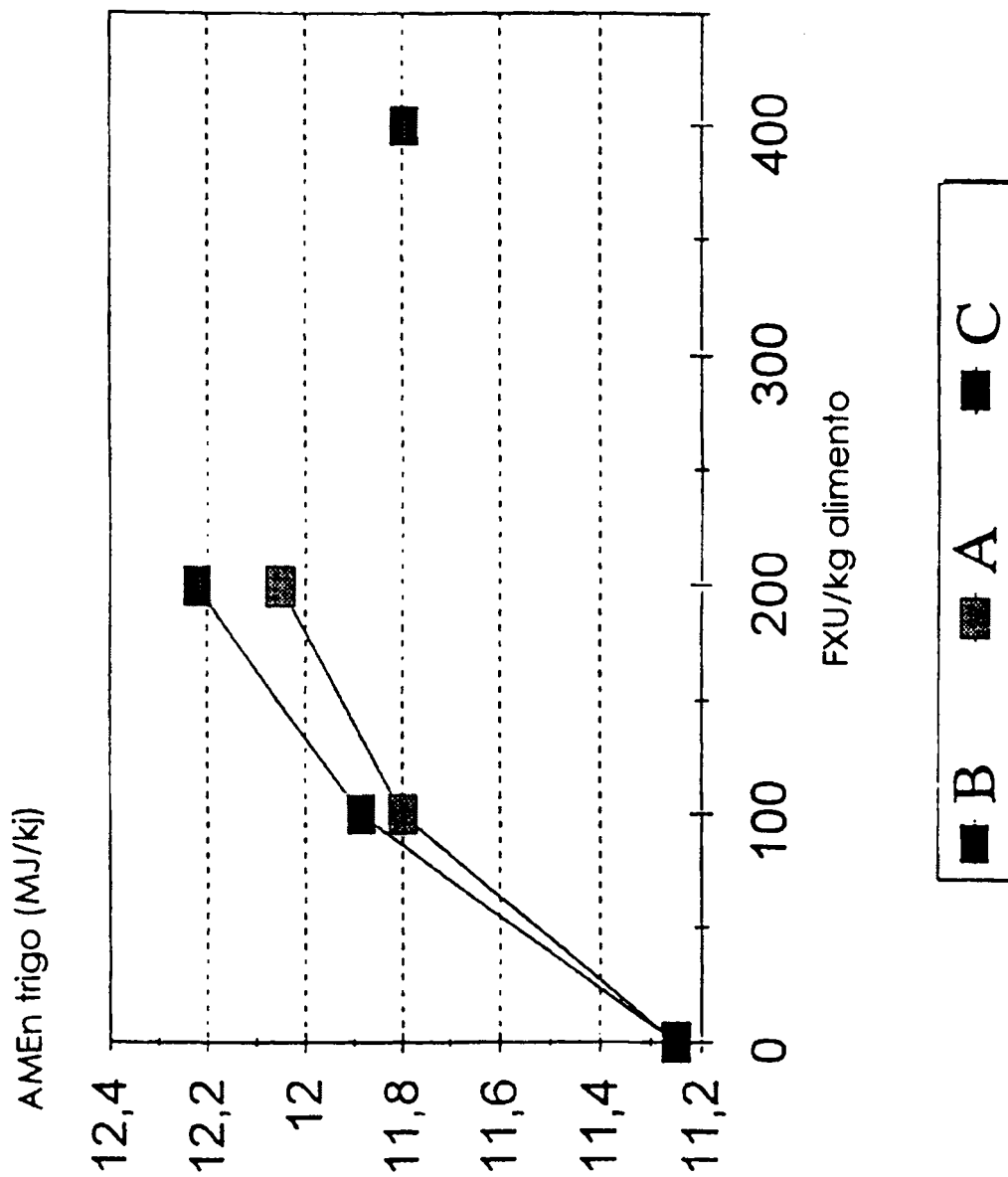


FIG. 6

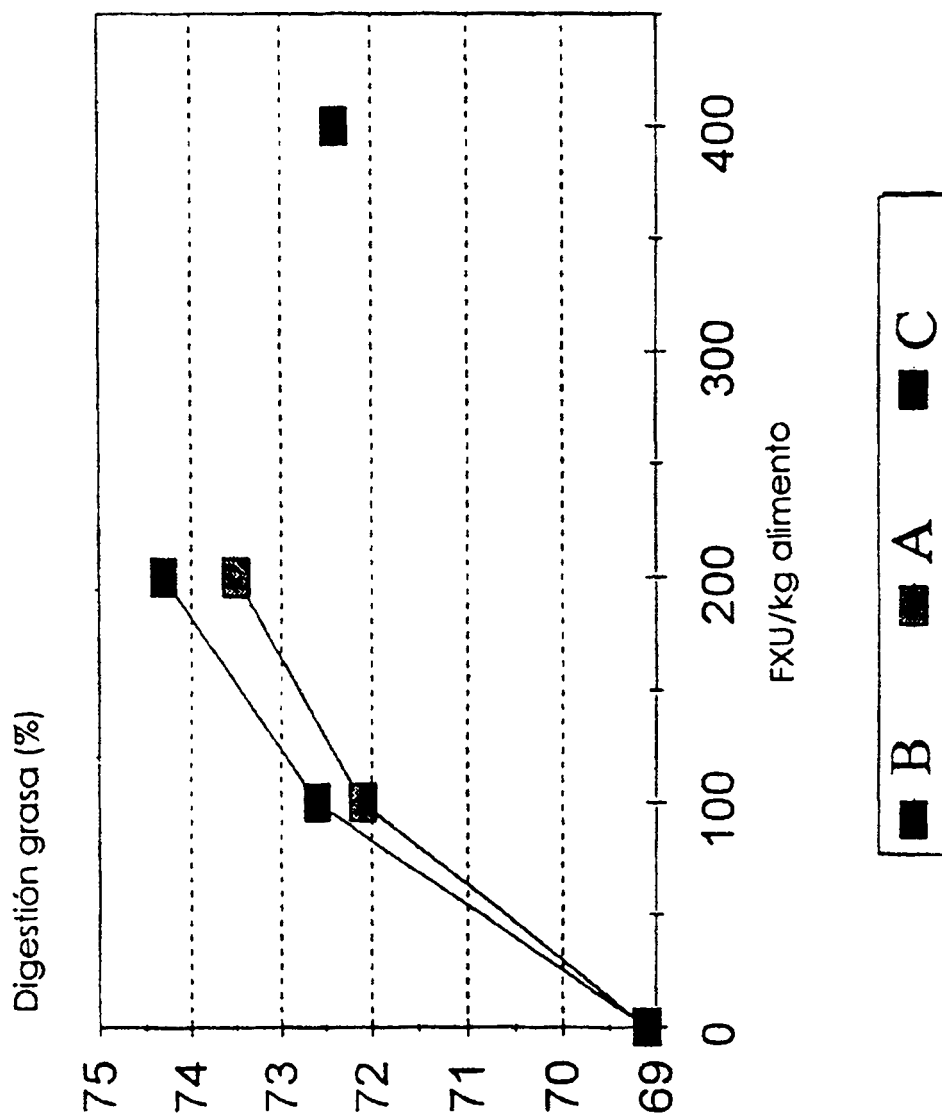


FIG. 7

ES 2 169 219 T5

LISTA DE SECUENCIAS

INFORMACIÓN PARA LA ID de SEC N°: 1:

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 983 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 10 (C) TIPO DE CADENA: única
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- 15 (vi) FUENTE ORIGINAL
- (A) ORGANISMO: *Thermomyces lanuginosus*
 - (B) CEPA: DSM 4109
- 20 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) LOCALIZACIÓN: 31..705

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:

30	TCBCCCCGAC GTCTTCAAT CCTTGCAGTG ATG GTC GGC TTT ACC CCC GTT GCC Met Val Gly Phe Thr Pro Val Ala 1 5	54
35	CYT GCG GCC TTA GCC GCG ACT GGG GCC CTG GCC TTC CCG GCA GGG AAT Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Gly Ala Leu Ala Phe Pro Ala Gly Asn 10 15 20	102
40	GCC ACG GAG CTC GAA AAG CBA CAG ACA ACC CCC AAC TCG GAG GGC TGG Ala Thr Glu Leu Glu Lys Arg Gln Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp 25 30 35 40	150
45	CAC GAT GGT TAT TAC TAT TCC TGG TGG AGT GAC GGT GGA GCG CAG GCC His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser Trp Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala 45 50 55	198
50	ACG TAC ACC AAC CTG GAA GGC GGC ACC TAC GAG ATC AGC TGG GGA GAT Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly Gly Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp 60 65 70	246
55	GGC GGT AAC CTC GTC GGT GGA AAG GGC TGG AAC CCC GGC CTG AAC GCA Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala 75 80 85	294
60	AGA GCC ATC CAC TTT GAG GGT GTT TAC CAG CCA AAC GGC AAC AGC TAC Arg Ala Ile His Phe Glu Gly Val Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr 90 95 100	342

ES 2 169 219 T5

	CTT BCG GTC TAC GGT TGG ACC CCG AAC CCG CTG GTC GAG TAT TAC ATC	390
	Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile	
	105 110 115 120	
5	GTC GAG AAC TTT GGC ACC TAT GAT CCT TCC TCC GGT GCT ACC GAT CTA	438
	Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asp Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu	
	125 130 135	
10	GSA ACT GTC GAG TGC GAC GGT AGC ATC TAT CGA CTC GGC AAG ACC ACT	486
	Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly Ser Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr	
	140 145 150	
15	CGC GTC AAC GCA CCT AGC ATC GAC GGC ACC CAA ACC TTC GAC CAA TAC	534
	Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr	
	155 160 165	
20	TGG TCG GTC CCG CAG GAC AAG CCG ACC AGC GGT ACC GTC CAG ACG GGC	582
	Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys Arg Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly	
	170 175 180	
25	TGC CAC TTC GAC GCC TGG GCT CCG GCT GGT TTG AAT GTC AAC GGT GAC	630
	Cys His Phe Asp Ala Trp Ala Arg Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp	
	185 190 195 200	
30	CAC TAC TAC CAG ATC GTT GCA ACG GAG GGC TAC TTC AGC AGC GGC TAT	678
	His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr	
	205 210 215	
35	GCT CCG ATC ACC GTT GCT GAC GTG GGC TAAGACGTAA CCTGGTGGTG	726
	Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp Val Gly	
	220 225	
40	ATCTCGCGAG GCAACABCCA ABAATGTCGT CABATGTGCC GTTGAAGGT ATTCAATCAG	785
	CATATCTGTC TGCCCTTCCB AGTGATACTT TGGAGGACTG TGGAGAACTT TGTCGAGCC	845
	TGCCCAGGAT CAGTAGTTGC TTTGCGGTGT TTTGCTCCCT ATTCTCGTGA AAAAATTGTT	905
	ATTGCTTCGT TGCTAGTGT ACATAGCCGA GCAATTGAGG CCTCACGCTT GGGAAAAAAA	965
45	AAAAAAAAA AAAAAAAAA	983

INFORMACIÓN PARA LA ID de SEC N°: 2:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 225 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

60

65

ES 2 169 219 T5

Met Val Gly Phe Thr Pro Val Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Phe Pro Ala Gly Asn Ala Thr Glu Leu Glu Lys Arg Gln
 20 25 30

Thr Thr Pro Asn Ser Glu Gly Trp His Asp Gly Tyr Tyr Tyr Ser Trp
 35 40 45

Trp Ser Asp Gly Gly Ala Gln Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Glu Gly Gly
 50 55 60

Thr Tyr Glu Ile Ser Trp Gly Asp Gly Gly Asn Leu Val Gly Gly Lys
 65 70 75 80

Gly Trp Asn Pro Gly Leu Asn Ala Arg Ala Ile His Phe Glu Gly Val
 85 90 95

Tyr Gln Pro Asn Gly Asn Ser Tyr Leu Ala Val Tyr Gly Trp Thr Arg
 100 105 110

Asn Pro Leu Val Glu Tyr Tyr Ile Val Glu Asn Phe Gly Thr Tyr Asp
 115 120 125

Pro Ser Ser Gly Ala Thr Asp Leu Gly Thr Val Glu Cys Asp Gly Ser
 130 135 140

Ile Tyr Arg Leu Gly Lys Thr Thr Arg Val Asn Ala Pro Ser Ile Asp
 145 150 155 160

Gly Thr Gln Thr Phe Asp Gln Tyr Trp Ser Val Arg Gln Asp Lys Arg
 165 170 175

Thr Ser Gly Thr Val Gln Thr Gly Cys His Phe Asp Ala Trp Ala Arg
 180 185 190

Ala Gly Leu Asn Val Asn Gly Asp His Tyr Tyr Gln Ile Val Ala Thr
 195 200 205

Glu Gly Tyr Phe Ser Ser Gly Tyr Ala Arg Ile Thr Val Ala Asp Val
 210 215 220

Gly
 225

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65