

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 182 818**

⑤① Int. Cl.⁷: C12N 15/56

C12N 9/24

C12N 15/80

C12Q 1/68

C12P 19/14

C11D 3/386

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **92902669.8**

⑧⑥ Fecha de presentación: **10.12.1991**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 562 003**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.1993**

⑤④ Título: **Sacarificación mejorada de celulosa por clonación y amplificación del gen de beta-glucosidasa de Trichoderma Reesei.**

③⑩ Prioridad: **10.12.1990 US 625140**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI: **16.03.2003**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente: **16.03.2003**

⑦③ Titular/es:
GENENCOR INTERNATIONAL, INC.
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

⑦② Inventor/es: **Fowler, Timothy;**
Barnett, Christopher, C. y
Shoemaker, Sharon

⑦④ Agente: **Díez de Rivera y Elzaburu, Ignacio**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCION

Sacarificación mejorada de celulosa por clonación y amplificación del gen de beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*.

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a preparaciones y composiciones de celulosa que presentan una capacidad celulolítica aumentada o reducida. La invención se refiere además a una secuencia de nucleótidos del gen *bgl1* que codifica la β -glucosidasa extracelular de un hongo filamentoso, a un vector plasmídico que contiene el gen que codifica la β -glucosidasa extracelular y a cepas transformadas con un mayor número de copias del gen de la β -glucosidasa (*bgl1*) introducido en el genoma. Más concretamente, la presente invención se refiere a cepas de *Trichoderma reesei* que presentan niveles de expresión aumentados del gen *bgl1*, lo que da como resultado niveles proteicos aumentados de la β -glucosidasa extracelular que se pueden usar, junto con otras composiciones, para producir un producto de celulosa con una mayor capacidad celulolítica.

20 **2. Estado de la técnica**

Las celulasas se conocen en la técnica como las enzimas que hidrolizan celulosa (enlaces β -1,4-glucano), originando de este modo la formación de glucosa, celobiosa, celooligosacáridos y similares. Según señalaron Wood et al., "Methods in Enzymology", 160, 25, páginas 234 y siguientes (1988) y en otros lugares, la celulosa producida por determinados microorganismos está compuesta por varias clases de enzimas diferentes que incluyen las que se identificaron como exocelobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) ("CBH"), endoglucanasas (EC 3.2.1.4) ("EG"), β -glucosidasas (EC 3.2.1.21) ("BG"). Además, las clasificaciones fúngicas de CBH, EG y BG se pueden ampliar adicionalmente para incluir múltiples componentes en cada clasificación. Por ejemplo, se han aislado múltiples CBHs y EGs de una diversidad de fuentes bacterianas y fúngicas, incluido *Trichoderma reesei* que contiene 2 CBHs, es decir CBH I y CBH II, y al menos 3 EGs, es decir los componentes EG I, EG II y EG III.

El sistema de celulosa completo, que comprende componentes de cada una de las clasificaciones de CBH, EG y BG, es necesario para convertir eficazmente las formas cristalinas de la celulosa en glucosa. Los componentes aislados son bastante menos eficaces, si es que lo son, en la hidrólisis de la celulosa cristalina. Además, se observa una relación sinérgica entre los componentes de la celulosa, especialmente si son de diferentes clasificaciones. Esto quiere decir que la efectividad del sistema de celulosa completo es significativamente mayor que la suma de las contribuciones de los componentes individuales de la misma clasificación. A este respecto, se conoce en la técnica que los componentes EG y los componentes CBH interactúan sinérgicamente para degradar la celulosa con mayor eficacia. Véase, por ejemplo, Wood, Biochem. Soc. Trans., 13, páginas 407-410 (1985).

La especificidad por el sustrato y el modo de acción de los diferentes componentes de la celulosa varían según la clasificación, lo que puede explicar la sinergia entre los componentes combinados. Por ejemplo, el modo de acción actualmente aceptado de la celulasa es que los componentes endoglucanasa hidrolizan los enlaces β -1,4-glucosídicos internos, especialmente en regiones de baja cristalinidad de la celulosa, y los componentes exocelobiohidrolasa hidrolizan la celobiosa por el extremo no reductor de la celulosa. La acción de los componentes endoglucanasa facilita enormemente la acción de las exocelobiohidrolasas creando nuevos extremos de cadena que son reconocidos por los componentes exocelobiohidrolasa.

50 Las β -glucosidasas son componentes esenciales del sistema de celulosa y son importantes para la degradación enzimática completa de la celulosa en glucosa. Las enzimas β -glucosidasa pueden catalizar la hidrólisis de alquil- y/o aril- β -D-glucósidos, tales como metil- β -D-glucósido y p-nitrofenil-glucósido, así como de glucósidos que contienen sólo residuos carbohidrato, tales como la celobiosa. La catálisis de la celobiosa mediante la β -glucosidasa es importante porque produce glucosa para el microorganismo y porque la acumulación de celobiosa inhibe las celobiohidrolasas y las endoglucanasas, reduciendo así la velocidad de hidrólisis de celulosa a glucosa.

Puesto que las β -glucosidasas pueden catalizar la hidrólisis de numerosos sustratos diferentes, es posible usar esta enzima en una variedad de aplicaciones diferentes. Por ejemplo, algunas β -glucosidasas pueden usar para liberar aroma de fruta mediante la catálisis de diversos glucósidos presentes en ella. De forma similar, algunas β -glucosidasas pueden hidrolizar el monoterpil- β -glucósido de uva que, después de la hidrólisis, representa una importante fuente potencial de aroma para vino, según describió Günata et

al., "Hydrolysis of Grape Monoterpenyl β -Glucosides by Various β -Glucosidases", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 38, páginas 1232-1236 (1990).

Además, las celulasas se pueden usar junto con levaduras para degradar biomasa a etanol, donde la celulasa degrada la celobiosa a glucosa la cual puede ser fermentada adicionalmente por las levaduras para producir etanol. Esta producción de etanol a partir de fuentes de celulosa fácilmente disponibles puede proporcionar una fuente estable y renovable de combustible. El uso de etanol como combustible presenta muchas ventajas en comparación con los productos combustibles de petróleo, tales como la reducción de la contaminación del aire en las ciudades, de la niebla contaminante y de los niveles de ozono, mejorando así el medio ambiente. Además, el etanol como fuente de combustible reduciría la dependencia de la importación de petróleo del extranjero y los suministros petroquímicos.

Sin embargo, el paso limitante más importante en la velocidad de la producción de etanol a partir de biomasa es la cantidad insuficiente de β -glucosidasa presente en el sistema para convertir eficazmente la celobiosa en glucosa. Por lo tanto, sería útil para la producción de etanol una composición de celulasa que contenga una mayor cantidad de β -glucosidasa.

Por el contrario, en algunos casos es deseable producir una composición de celulasa que sea deficiente en β -glucosidasa y que, preferentemente, carezca de ella. Tales composiciones resultarían ventajosas en la producción de celobiosa y otros celooligosacáridos.

Las β -glucosidasas están presentes en una variedad de organismos procarióticos, así como en organismos eucarióticos. Se ha clonado el gen que codifica la β -glucosidasa de varios organismos procarióticos, y el gen es capaz de dirigir la síntesis de cantidades detectables de proteína en *E. coli* sin la necesidad de extensa ingeniería genética, aunque en algunos casos es necesario acoplarlo con un promotor proporcionado por el vector. Sin embargo, tales organismos no producen las β -glucosidasas en cantidades comercialmente factibles.

Además, estos genes procarióticos a menudo no se pueden expresar y detectar después de la transformación del huésped eucariótico. Así, con el fin de usar cepas fúngicas, se tendría que clonar genes fúngicos usando los métodos descritos en la presente memoria o mediante la detección con el gen *bgl1* de *T. reesei* por hibridación de ácidos nucleicos.

La contribución y bioquímica del componente β -glucosidasa en la hidrólisis de celulosa se complica por la aparente multiplicidad de formas enzimáticas asociada con *T. reesei* y otras fuentes fúngicas (Enari et al., "Purification of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* β -glucosidase", *J. Appl. Biochem.*, vol. 3, páginas 157-163 (1981); Umile et al., "A constitutive, plasma membrane bound β -glucosidase in *Trichoderma reesei*", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 34, páginas 291-295 (1986); Jackson et al., "Purification and partial characterization of an extracellular β -glucosidase of *Trichoderma reesei* using cathodic run, polyacrylamide gel electrophoresis", *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 32, páginas 903-909 (1988)). Estos y muchos otros autores informan de enzimas β -glucosidasas cuyo tamaño oscila entre 70 y 80 Kd y el pI entre 7,5 y 8,5. Los datos más recientes sugieren que las formas β -glucosidasa extracelular y asociada a la pared celular son la misma enzima (Hofer et al., "A monoclonal antibody against the alkaline extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: reactivity with other *Trichoderma* β -glucosidasas", *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 992, páginas 298-306 (1989); Messner y Kubicek, "Evidence for a single, specific β -glucosidase in cell walls from *Trichoderma reesei* QM9414", *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 12, páginas 685-690 (1990)) y que la variación de tamaño y del pI es el resultado de una modificación post-traduccional y de los métodos heterogéneos de purificación de la enzima. No se sabe si la especie β -glucosidasa intracelular con un pI de 4,4 y un peso molecular aparente de 98.000 es una β -glucosidasa nueva (Inglin et al., "Partial purification and characterization of a new intracellular β -glucosidase of *Trichoderma reesei*", *Biochem. J.*, vol. 185, páginas 515-519 (1980)) o un fragmento proteolítico de la β -glucosidasa extracelular alcalina asociado con otra proteína (Hofer et al., arriba).

Puesto que la mayor parte de la actividad β -glucosidasa detectable permanece unida a la pared celular (Kubicek, "Release of carboxymethylcellulase and β -glucosidase from cell walls of *Trichoderma reesei*", *Eur. J. Appl. Biotechnol.*, vol. 13, páginas 226-231 (1981); Messner y Kubicek, arriba; Messner et al., "Isolation of a β -glucosidase binding and activating polysaccharide from cell walls of *Trichoderma reesei*", *Arch. Microbiol.*, vol. 154, páginas 150-155 (1990)), se piensa que las preparaciones comerciales de celulasa presentan una capacidad reducida de producir glucosa debido a las concentraciones relativamente bajas de β -glucosidasa en la preparación de celulasa purificada.

Para superar el problema de que la β -glucosidasa limita la velocidad en la producción de glucosa a

partir de celulosa usando celulasa producida por un hongo filamentoso, la técnica describe la suplementación del sistema celulolítico de *Trichoderma reesei* con la β -glucosidasa de *Aspergillus*, y los resultados indican un aumento de la velocidad de sacarificación de celulosa a glucosa. Duff, *Biotechnol Letters*, 7, 185 (1985). También se han alterado las condiciones de cultivo del hongo para aumentar la actividad β -glucosidasa en *Trichoderma reesei*, como se ilustra en Sternberg et al., *Can. J. Microbiol.*, 23, 139 (1977) y Tanguy et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 1837 (1981), y se ha informado de que cepas mutantes obtenidas por mutación ultravioleta potencian la producción de β -glucosidasa en *Trichoderma reesei*. Aunque estos métodos antes mencionados aumentan la cantidad de β -glucosidasa en *Trichoderma reesei*, los métodos carecen de utilidad y, en muchos casos, no son comercialmente factibles.

Lo ideal sería disponer de una cepa obtenida por ingeniería genética de *Trichoderma reesei* o de otros hongos filamentosos que produjera una cantidad aumentada de β -glucosidasa, no sólo para producir un sistema de celulasa eficaz sino también para usar los niveles mayores de expresión del gen *bgl1* para producir un producto de celulasa con una mayor capacidad celulolítica. Una cepa de este tipo se puede producir de forma factible usando la técnica de transformación.

Sin embargo, con el fin de transformar cepas mutantes de *Trichoderma reesei* u otros hongos filamentosos, se ha de caracterizar primero la secuencia de aminoácidos del gen *bgl1* de *Trichoderma reesei* o de otros hongos filamentosos de manera que el gen *bgl1* se pueda clonar e introducir en cepas mutantes de *Trichoderma reesei* o de otros hongos filamentosos.

Adicionalmente, una vez que se ha identificado el gen *bgl1*, la información contenida en los fragmentos lineales del gen *bgl1* se puede usar para preparar cepas de *Trichoderma reesei* y de otros hongos filamentosos que produzcan composiciones de celulasa exentas de β -glucosidasa.

Por consiguiente, esta invención se dirige en parte a la caracterización del gen *bgl1* que codifica la β -glucosidasa extracelular o unida a la pared celular de *Trichoderma reesei* y de otros hongos filamentosos. Esta invención se dirige además a la clonación del gen *bgl1* en un vector plasmídico que se puede usar en el proceso de transformación y para introducir el gen *bgl1* en el genoma de *Trichoderma reesei* o de otros hongos filamentosos en múltiples copias, generando de este modo cepas transformadas que producen una composición de celulasa con un aumento significativo de la actividad β -glucosidasa. Además, también se describen las composiciones de celulasa que poseen una capacidad celulolítica aumentada.

Esta invención se dirige adicionalmente, en parte, a copias alteradas del gen *bgl1* que pueden cambiar las propiedades de la enzima y que se pueden volver a introducir en el genoma de *Trichoderma reesei* o de otros hongos filamentosos.

Compendio de la invención

La secuencia de aminoácidos de la proteína β -glucosidasa extracelular o unida a la pared celular de *Trichoderma reesei* se ha obtenido ahora con el suficiente detalle para permitir la clonación del gen *bgl1* en un vector plasmídico adecuado. Este vector plasmídico se puede usar después para transformar cepas de hongos filamentosos para producir transformantes que presentan múltiples copias del gen *bgl1* introducidas en ellos.

Por consiguiente, en uno de sus aspectos de procedimiento, la presente invención se refiere a un procedimiento para expresar β -glucosidasa extracelular potenciada en un hongo filamentoso, que comprende la expresión de una secuencia de ADN fúngica que codifica la β -glucosidasa potenciada en un microorganismo huésped recombinante, siendo dicho microorganismo huésped recombinante un hongo filamentoso transformado con un vector de expresión que contiene dicha secuencia de ADN.

En otro aspecto de procedimiento más, la presente invención se refiere a un procedimiento para expresar una β -glucosidasa extracelular alterada en un hongo filamentoso.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a la secuencia de aminoácidos de la β -glucosidasa extracelular de *Trichoderma reesei*.

En otro aspecto más, la presente invención se dirige al uso de un fragmento de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos total o parcial del gen de la β -glucosidasa extracelular de *T. reesei* como sonda para identificar y clonar el gen *bgl1* equivalente de otros hongos filamentosos β -glucosídicos.

En uno de sus aspectos de composición, la presente invención se dirige a transformantes nuevos y

útiles de *Trichoderma reesei*, que se pueden usar para producir composiciones de celulasa fúngicas enriquecidas en β -glucosidasa o carentes de β -glucosidasa. Asimismo se contempla en la presente invención la alteración del gen *bgl1* y la introducción del gen *bgl1* alterado en *T. reesei* para producir transformantes que también se pueden usar para producir composiciones de celulasa fúngicas alteradas.

5

En otro aspecto de composición, la presente invención se dirige a composiciones de celulasa fúngicas preparadas por medio de las cepas de *Trichoderma reesei* transformadas.

Breve descripción de los dibujos

10

La Fig. 1 representa la secuencia de nucleótidos y la estructura primaria deducida de aminoácidos del gen *bgl1* completo de *T. reesei*.

La Fig. 2 es una representación esquemática del vector *pSAS β -glu*.

15

La Fig. 3A es una representación figurativa del vector *pSAS $\Delta\beta$ Glu bal pyr* (Δ 36).

La Fig. 3B es una representación figurativa del vector *pUC $\Delta\beta$ -Glu A/R pyr* (Δ 12).

20

La Fig. 4 representa una transferencia Northern de ARN total aislado de las cepas transformadas de *Trichoderma reesei* después de la inducción con soforosa usando las sondas de *cbh2* y un fragmento de 700 pb de ADNc de *bgl1*.

25

La Fig. 5A representa una autorradiografía de una transferencia Southern de ADN de *T. reesei* que ilustra la presencia del gen de la β -glucosidasa en *T. reesei* de tipo silvestre (RL-P37) en comparación con cepas de *T. reesei* modificadas genéticamente para que no incluyan el gen de la β -glucosidasa (Δ 12 y Δ 36).

30

La Fig. 5B representa una autorradiografía de una transferencia Northern de ARN de *T. reesei* que ilustra la expresión del gen de la β -glucosidasa en *T. reesei* de tipo silvestre (RL-P37) en comparación con cepas de *T. reesei* modificadas genéticamente para que no incluyan el gen de la β -glucosidasa (Δ 12 y Δ 36).

35

La Fig. 5C representa un análisis de las proteínas expresadas por las cepas P37 (tipo silvestre), Δ 12 y Δ 36 de *Trichoderma reesei* e ilustra la ausencia de β -glucosidasa en las proteínas expresadas por las cepas Δ 12 y Δ 36 de *Trichoderma reesei*.

40

La Fig. 6 representa una autorradiografía de ADN genómico digerido con *Hind* III de una cepa de *T. reesei* superproductora (carril 9) y de transformantes *pSAS β -Glu* (carriles 1-8), transferido e hibridado con la sonda β -Glu de 700 pb.

45

La Fig. 7 representa una curva que ilustra la hidrólisis de Avicel usando la dosificación de sustrato:enzima de 80:1 de una composición de β -glucosidasa recombinante enriquecida producida mediante la presente invención.

50

La Fig. 8 representa una curva que ilustra la hidrólisis de PSC usando la dosificación de sustrato:enzima de 300:1 de una composición de β -glucosidasa recombinante enriquecida producida mediante la presente invención.

55

La Fig. 9 representa una curva que ilustra la velocidad de hidrólisis de fibras derivadas de un pañal celulósico usando una composición de β -glucosidasa recombinante enriquecida producida mediante la presente invención.

60

Las Figs. 10A y 10B son autorradiografías de ADN genómico de *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisea* digerido con *Hind* III y *Eco* RI y transferido e hibridado con un fragmento de ADN que contiene el gen *bgl1* de *Trichoderma reesei*.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención

60

Como se usa en la presente memoria, la expresión “ β -glucosidasa extracelular potenciada” o “ β -glucosidasa potenciada” significa que se ha introducido en el genoma al menos una copia adicional de un gen que codifica la β -glucosidasa extracelular.

La expresión “ β -glucosidasa alterada” o “gen de la β -glucosidasa alterado” significa que la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada se ha alterado eliminando, añadiendo y/o manipulando la secuencia de ácido nucleico del gen o la secuencia de aminoácidos de la proteína.

5

La expresión “por medios recombinantes” señala que se ha transformado un microorganismo con una molécula de ADN creada en un tubo de ensayo ligando entre sí trozos de ADN que normalmente no son contiguos.

10

La expresión “celulasa exenta de β -glucosidasa extracelular” se refiere a una composición de celulasa que no contiene enzima β -glucosidasa extracelular funcional. Tales composiciones se preparan preferentemente cultivando un hongo filamentoso en el que se ha delecionado o interrumpido el gen de la β -glucosidasa. Preferentemente, estas composiciones se preparan cultivando un hongo filamentoso en el que se ha delecionado el gen de la β -glucosidasa.

15

La expresión “hongos filamentosos” se refiere a todos y cada uno de los hongos filamentosos reconocidos en la técnica.

20

La expresión “hongos filamentosos β -glucosídicos” se refiere a aquellos hongos filamentosos que producen una composición de celulasa que contiene β -glucosidasa.

El término “celooligosacárido” se refiere a aquellos grupos de oligosacáridos que contienen de 2 a 8 unidades de glucosa con enlaces β -1,4. Tales celooligosacáridos incluyen celobiosa (diglucosa con un enlace β -1,4) y provienen, preferentemente, de celulosa.

25

Más específicamente, la presente invención se refiere al aislamiento y la caracterización del gen *bgl1* que codifica la proteína extracelular o unida a la pared celular de *Trichoderma reesei* (denominado algunas veces “*T. reesei*”) y a la secuencia de nucleótidos y aminoácidos específica de este gen. El gen *bgl1* se clona en vectores plasmídicos, los cuales se usan posteriormente para producir cepas transformadas de *T. reesei* y de otros hongos filamentosos con copias adicionales del gen *bgl1* insertadas en las mismas. Estos transformantes se usan después para producir composiciones de celulasa que tienen una actividad β -glucosidasa aumentada y, de este modo, una mayor degradación celulolítica.

30

La presente invención también contempla la manipulación de la secuencia de aminoácidos en el gen *bgl1* mismo. La alteración de los sitios activos de esta enzima puede provocar una variedad de cambios diferentes en la conversión catalítica. Por ejemplo, puesto que la β -glucosidasa presenta tanto una actividad hidrolasa como transferasa, la alteración de la secuencia de aminoácidos puede tener como resultado la eliminación de la actividad hidrolasa y un aumento de la actividad transferasa, y facilitar así la síntesis de oligodextrinas β -1,4. Además, la manipulación de la secuencia de aminoácidos de la β -glucosidasa puede provocar cambios adicionales en el sistema, como pH óptimo diferente, temperatura óptima diferente, velocidad de recambio catalítica (V_{max}) alterada, afinidad (Km) por celobiosa alterada que conduce a una mayor afinidad por celobiosa o a una menor afinidad por celobiosa dando como resultado una velocidad de reacción más baja o cero, perfil de inhibición por producto alterado de manera que niveles más bajos o más altos de glucosa inhibirán la actividad β -glucosidasa, y similares.

45

Además, un fragmento de ácido nucleico que contiene la secuencia de nucleótidos completa del gen de la β -glucosidasa extracelular de *T. reesei* o una parte de ella también se puede marcar y usar como sonda para identificar y clonar el gen *bgl1* equivalente en otros hongos filamentosos.

50

En general, la presente invención implica el aislamiento del gen *bgl1* de *T. reesei* mediante la identificación de un fragmento de ADNc de 700 pb del gen, que se usa después como sonda para identificar un único fragmento de *T. reesei* que contiene el gen *bgl1* que seguidamente se clona. Debido a la homología del gen *bgl1* entre las especies, se puede emplear una sonda que emplea un fragmento del gen *bgl1* de *T. reesei* para identificar el gen *bgl1* en otros microorganismos celulolíticos, y se entiende que la descripción siguiente para *T. reesei* también se puede aplicar a otros hongos filamentosos β -glucosídicos.

55

En el caso de *T. reesei*, este fragmento de 6,0 kb se clona después en un plásmido pUC y se realiza una serie de experimentos de mapeo para confirmar que el gen *bgl1* completo está contenido en este fragmento. Después se determina la secuencia de nucleótidos en ambas cadenas, y se puede confirmar la posición de dos intrones mediante el análisis de la secuencia de subclones de ADNc de *bgl1* que abarcan las uniones intrón/exón. Después de aislar el gen *bgl1*, se introducen copias adicionales del gen *bgl1* en *T. reesei* o en otras cepas de hongo filamentoso para aumentar la expresión de la β -glucosidasa.

60

El aislamiento del gen *bgl1* a partir de *T. reesei* implica la purificación de la β -glucosidasa extracelular, la degradación química y proteolítica de esta enzima, el aislamiento y la determinación de la secuencia de los fragmentos proteolíticos y el diseño de sondas de ADN oligoméricas sintéticas usando la secuencia proteica. Las sondas oligoméricas se usan después para identificar un fragmento de ADNc de 700 pb de la β -glucosidasa, que se puede marcar y emplear para identificar posteriormente un fragmento que contiene el gen *bgl1* completo dentro del fragmento procedente de ADN genómico digerido de *T. reesei*.

Para identificar un posible fragmento de ADNc que se pueda usar como sonda para futuros análisis, en primer lugar se aísla el ARN total de micelios de *T. reesei* y a partir de él se aísla el ARN poliadenilado. El ARN poliadenilado se usa después para producir una mezcla de ADNc que después se amplifica usando cebadores oligonucleotídicos específicos que amplifican únicamente el fragmento de ADNc específico que codifica el gen *bgl1* de *T. reesei*.

Más específicamente, en primer lugar se aísla el ARN total a partir de una cepa inicial de *T. reesei*. La cepa inicial empleada en la presente invención puede ser cualquier cepa de *T. reesei* superproductora de celulasa que se conozca en la técnica. Esta cepa productora de celulasa se crea generalmente a partir de cualquier cepa de *T. reesei* mediante métodos habituales de mutagénesis y selección conocidos en la técnica. La confirmación de que la cepa seleccionada superproduce las celulasas se puede realizar usando métodos de análisis conocidos. Una cepa preferida es RLP37, que es fácilmente accesible.

Se añade un inóculo micelial de la cepa superproductora de *T. reesei* crecida en un medio de cultivo apropiado a un medio básico y se incuba durante un periodo de entre 60 y 65 horas a una temperatura de entre 25°C y 32°C, preferentemente a 30°C. Se puede sustituir el medio básico fresco durante este periodo de incubación. Después se centrifuga el medio de cultivo, y de él se aíslan los micelios y se lavan. Los micelios se resuspenden después en un tampón para permitir su crecimiento y se añade soforosa 1 mM (un dímero β -1,2 de glucosa) a los micelios para inducir la producción de las enzimas celulasas. La preparación de micelios se incuba después durante un periodo de tiempo adicional, preferentemente durante 18 horas a 30°C, antes de recogerla.

El ARN total se puede aislar de la preparación de micelios mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como la lisis con proteinasa K seguida de una extracción con fenol:cloroformo, una extracción con isotiocianato de guanidinio seguida de gradientes de cloruro de cesio, una extracción con hidrocloreuro de guanidina y disolventes orgánicos, y similares. Es preferible aislar el ARN total mediante el procedimiento descrito por Timberlake et al. en "Organization of a Gene Cluster Expressed Specifically in the Asexual Spores of *A. nidulans*", *Cell*, 26, páginas 29-37 (1981). Los micelios se aíslan del medio de cultivo por filtración. El ARN se extrae después de los micelios mediante la adición de un tampón de extracción, fenol saturado con TE y cloroformo. La fase acuosa se elimina y la fase orgánica se reextrae con el tampón de extracción solo calentando la mezcla de extracción en un baño de agua a una temperatura de entre aproximadamente 60°C y 80°C, preferentemente a 68°C, para liberar el ARN atrapado en los polisomas y en la interfase. Después se reúnen todas las fases acuosas extraídas, se centrifugan y se reextraen con fenol-cloroformo hasta que ya no quede proteína en la interfase. El ARN se precipita adicionalmente con 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2 volúmenes de etanol al 95 % y se sedimenta mediante centrifugación antes de resuspenderlo en agua DEP que contiene un inhibidor de la RNasa.

El ARN total se fracciona después en geles de formaldehído-agarosa al 1 %, se transfiere a membranas NytranTM y se hibrida usando un fragmento del gen *cbh2* de *T. reesei* para determinar si realmente se han inducido los genes que codifican las enzimas del sistema de celulasa en la preparación de *T. reesei* mediante la adición de la soforosa. Básicamente, la sonda usada en la presente invención proviene de un clon de CBH II producido mediante métodos conocidos en la técnica. Para más detalles sobre cómo se produjo el clon, véase Chen et al., "Nucleotide Sequence and Deduced Primary Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*", *Bio/technology*, vol. 5 (marzo 1987). Se realizó mutagénesis dirigida en el clon de CBH II y se introdujo un sitio *Bgl* II en el extremo 5' exacto del marco de lectura abierto y un sitio *Nhe* I en el extremo 3' exacto. El fragmento de restricción entre *Bgl* II y *Nhe* I que contenía la secuencia codificante de CBH II se clonó adicionalmente en un fagómido pUC218. El gen CBH II se cortó adicionalmente y se aisló en gel antes de añadir una marca.

Los resultados de la transferencia Northern del ARN de *T. reesei* hibridado con la sonda de *cbh2* indicaron que el nivel de ARNm específico de *cbh2* alcanzó un pico a las 14-16 horas después de la inducción. De estos datos se puede inferir que en este momento se induce el complejo de celulasa completo, que incluye la β -glucosidasa. Después se reúne el ARN total de las 14, 18 y 22 horas.

Después de reunir las fracciones específicas de ARN total, se aísla posteriormente el ARNm poliadenilado del ARN total. La poliadenilación post-transcripcional es una característica común de la biogénesis de la mayoría de los ARNm eucarióticos. Los ARNm recién sintetizados presentan tramos largos de poli(A) que tienden a acortarse a medida que los ARNm envejecen. El ARNm poliadenilado recién sintetizado se aísla adicionalmente del ARN total mediante métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen el uso de oligo(dT)-celulosa, poli(U) Sepharose, adsorción a y elución de filtros de poli(U) o filtros de membrana de nitrocelulosa y similares. Se prefiere usar la cromatografía en oligo(dT)-celulosa para aislar el ARNm según el procedimiento descrito por Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Más específicamente, se hacen pasar fracciones de ARN total a través de la resina cromatográfica, y el ARNm se eluye de ella con un tampón de elución. El ARN que se une a la columna está enriquecido en ARN que contiene colas poli(A) y, por lo tanto, elimina contaminantes tales como ARNr y ARNm parcialmente degradado. Es importante que la purificación se lleve a cabo con éxito, de forma que cuando se sintetice el ADNc a partir del ARNm se obtengan mayores rendimientos de copias de ARNm y menos copias falsas de ARN no mensajero.

El ARN total y el ARN poliadenilado de las preparaciones se fraccionaron adicionalmente en geles de formaldehído al 1%, se transfirieron a membranas Nytran^R y se analizaron para confirmar que las enzimas presentes en el complejo de celulasa se inducían como ARNm poliadenilado.

Después de aislar el ARNm poliadenilado del ARN total, se sintetiza a partir de él ADN complementario, o ADNc. La primera cadena del ADNc se sintetiza usando la enzima DNA polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa) para catalizar la reacción. En la presente invención se puede usar la transcriptasa inversa de aves, que se purifica a partir de partículas de un retrovirus de aves, o la transcriptasa inversa murina, que se aísla de una cepa de *E. coli* que expresa una copia clonada del gen de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Malony. Sin embargo, se prefiere usar la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Malony (M-MLV) para sintetizar la primera cadena de ADNc a partir de la población de ARNm poliadenilado. La cantidad de transcriptasa inversa de M-MLV clonada requerida puede variar en función de la cantidad de ARNm poliadenilado usada en la reacción de síntesis. Normalmente se usan aproximadamente 200 U/ μ l de la transcriptasa inversa por 2 a 10 μ g de ARNm por reacción.

En la mezcla de síntesis también está presente un cebador para iniciar la síntesis de ADN. Se puede usar cualquier cebador para la clonación de ADNc, pero se prefiere usar oligo(dT) que contiene de 12 a 18 nucleótidos de longitud y que se une al tramo poli(A) en el extremo 3' de las moléculas de ARNm de células eucarióticas. El cebador se añade a la mezcla de reacción en gran exceso, de manera que cada molécula de ARNm se une a varias moléculas de oligo(dT)₁₂₋₁₈. Se prefiere usar aproximadamente 12,5 μ g de cebador a una concentración de 0,5 mg/ml.

Además de la enzima y del cebador, normalmente completan la combinación de reacción un tampón y una mezcla de dNTP que contiene dATP, dCTP, dGTP y dTTP, a una concentración final de 500 μ M cada uno. Para la síntesis de la primera cadena de ADNc se puede usar en la presente invención cualquier tampón que sea compatible con esta síntesis. Se prefiere usar un sistema tamponante que consta de Tris-HCl 250 mM (pH 8,3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM y ditiotreitól 50 mM. En general, aproximadamente 500 μ l de tampón completan la solución de síntesis.

Una vez sintetizada la primera cadena, se puede sintetizar la segunda cadena de ADNc mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica, tales como síntesis cebada con horquilla por desnaturalización del complejo ADNc:ARNm, adición del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* o de la transcriptasa inversa y después digestión de la estructura en horquilla con la nucleasa S1 para obtener una molécula de ADNc de cadena doble, el método de Okayama y Berg, el método de Gubler y Hoffman y similares. El método de Okayama y Berg usa la RNasa H de *E. coli* para cortar el ARNm al azar, y el ARN se sustituye en la reacción de traslado de cortes mediante la catálisis con la DNA polimerasa I de *E. coli*. En el método de Okayama y Berg se usa ARNm para cebar la síntesis de ADN mediante la DNA polimerasa I de *E. coli*.

El método preferido para sintetizar la segunda cadena de ADNc es un método modificado del procedimiento de Gubler y Hoffman. Este procedimiento usa la RNasa H, la DNA polimerasa I y la DNA ligasa de *E. coli* para formar la segunda cadena. En realidad, en la presente invención se pueden usar dos métodos diferentes para proceder con la síntesis de la segunda cadena. El primer procedimiento usa la RNasa H para atacar el híbrido ARN:ADN de una manera aleatoria, produciendo cortes adicionales a los producidos mediante la transcriptasa inversa. Si se introducen demasiados cortes en el ARN en

el extremo 5' del mensajero antes de que comience la síntesis de la segunda cadena, se pueden producir fragmentos que son demasiado cortos para permanecer hibridados; de este modo, no podrán servir de cebadores. Además, el oligómero de ARN más 5' que ceba la síntesis de ADN de la segunda cadena continuará degradándose hasta que queden tan solo dos ribonucleótidos en el extremo 5' del ADN de la
 5 segunda cadena. Éstos son sustratos para la actividad RNasa H de la polimerasa I, y los nucleótidos que quedan serán eliminados. Esto deja el extremo 3' del ADNc de la primera cadena en forma de cadena sencilla, lo que la convierte en un sustrato para la actividad 3' exonucleasa de la polimerasa I. El resultado es una población de ADNc con extremos romos.

10 Un método alternativo cuenta con la transcriptasa inversa de M-MLV para producir cortes a entre 10 y 20 bases del extremo 5' del ARN en el híbrido. Se usa después la DNA polimerasa I para la síntesis. En general se usan aproximadamente 500 unidades de DNA polimerasa I a una concentración de 10 U/ μ l. Después de la síntesis de la segunda cadena, se añade la RNasa H tras eliminar la DNA polimerasa I para producir un dúplex formado en su totalidad por ADN, excepto el oligonucleótido 5' de ARN protegido
 15 superviviente.

La síntesis de la segunda cadena mediante cualquiera de los dos procedimientos antes expuestos tiene lugar habitualmente en presencia de un tampón y una mezcla de dNTP. Se puede usar cualquier sistema tamponante conocido en la técnica para la síntesis del ADNc de la segunda cadena; sin embargo, se prefiere usar un sistema tamponante que contiene Tris-HCl 188 mM, pH 8,3, KCl 906 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 mM, MgCl₂ 46 mM, ditiotreitól 37,5 mM y NAD 1,5 mM. La mezcla de dNTO contiene preferiblemente dATP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10 mM y dTTP 10 mM.
 20

La síntesis de la segunda cadena se realiza mediante procedimientos conocidos descritos en la técnica. Los métodos y reactivos preferidos usados para sintetizar el ADNc en la presente invención son los sistemas BRL cDNA Synthesis System^R (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Maryland) y Librarium System (Invitrogen, San Diego, CA).
 25

En este punto, después de la síntesis de la segunda cadena, está presente una mezcla de ADNc de la cual una pequeña proporción codifica el gen *bgl1*. Puesto que la amplificación de únicamente el fragmento específico del gen *bgl1* en la mezcla de ADNc es crucial para el aislamiento de este gen de la β -glucosidasa, se diseñaron cebadores específicos para amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de ADNc que codifica el gen *bgl1* de *T. reesei*. Los cebadores usados son cebadores de generados diseñados para hibridar con el ADNc del gen *bgl1* que codifica el extremo N terminal y un
 35 fragmento interno de CNBr.

En general, resulta difícil aislar el gen *bgl1* porque la secuencia de aminoácidos de la proteína no contiene suficientes aminoácidos codificados por tripletes de ácido nucleico únicos y, de este modo, cualquier oligonucleótido usado estaría demasiado degenerado para amplificar específicamente el gen *bgl1* en la
 40 reacción de PCR. Sin embargo, en esta invención se diseñaron cebadores examinando los aminoácidos de la región diana para la amplificación de la β -glucosidasa madura y eligiendo las regiones que requerirán un grado reducido de degeneración en el código genético. El sesgo del codón en *T. reesei* para diversos otros genes de celulasa, tales como *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y similares, también se tuvo en cuenta a la hora de diseñar los cebadores oligonucleotídicos. Más específicamente, el sesgo del codón se basa en diversos genes
 45 de la cepa *T. reesei* que muestran un triplete preferido que codifica diferentes aminoácidos. Mediante el análisis de este sesgo del codón se puede determinar la preferencia por una secuencia de nucleótidos concreta que codifica un aminoácido. Por ejemplo, los genes *cbh1*, *cbh2* y *egl1* de *T. reesei* prefieren que CCU codifique el aminoácido prolina. Así, al diseñar una sonda oligonucleotídica, la secuencia CUG sería la elección preferida para leucina en lugar de los otros tripletes (CUU, CUC, CUA, UUA y CUG) que
 50 codifican leucina.

Además, tras seleccionar una región N terminal y una región interna como cebadores para fines de amplificación, los cebadores se diseñaron insertando una base inosina no específica en la posición de tambaleo del cebador para el extremo N terminal y usando una mezcla de dieciséis secuencias cebadoras
 55 variables para el cebador interno. Básicamente, la creación de los cebadores degenerados la describen Compton en "Degenerate Primers For DNA Amplification" y Lee et al. en "cDNA Cloning Using Degenerate Primers" en *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, publicado por Academic Press (1990).

60 Usando los cebadores antes descritos se amplifican después selectivamente por PCR las secuencias de ADNc que codifican la región amino terminal del gen *bgl1*. El método de amplificación consiste en un ciclo inicial desnaturalizante de aproximadamente 5 a 15 minutos a 95°C, seguido de una etapa de alineamiento

de 1 a 7 minutos a una temperatura de 35°C a 55°C y, preferentemente, de 45°C a 55°C, y un ciclo de polimerización de 5 a 15 minutos a 65°C. Sin embargo, se prefiere usar un ciclo inicial desnaturalizante de 10 minutos, seguido de un alineamiento de 2 minutos a 50°C y de un ciclo de polimerización de 10 minutos, preferentemente de 30 minutos, a las temperaturas antes descritas.

5

El fragmento amplificado se identifica después por electroforesis en gel en forma de un segmento de ADNc de 700 pb. La mezcla amplificada de ADNc se fracciona después adicionalmente en un gel de poliacrilamida para obtener un fragmento de ADNc de 700 pb más purificado para fines de clonación. Después de la elución de los fragmentos de 700 pb del gel, los fragmentos de ADNc de 700 pb se clonan en vectores fagómidos. Se puede usar cualquier vector de clonación para clonar los fragmentos de ADNc del gen *bgl1*, tales como pUC18, pUC19, pUC118, pUC119, pBR322, pEMBL, pRSA101, pBluescript y similares. Sin embargo, se prefiere usar los vectores de clonación pUC218 y pUC219, que derivan de pUC18 y pUC19 mediante la inserción de la región intergénica de M13. Los vectores de clonación con los fragmentos de ADNc que contienen el gen *bgl1* se usan después para transformar la cepa JM101 de *E. coli*. Después de la transformación se identificaron las colonias positivas que contenían el gen *bgl1* y se aisló de ellas el ADN usando métodos de extracción con cloroformo:fenol y de precipitación con etanol.

10

15

La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 700 pb subclonado se determina después mediante el método de terminación de cadena con didesoxinucleótido descrito por Sanger et al., usando un conjunto de reactivos Sequenase^R suministrado por U.S. Biochemicals.

20

A partir de esta secuencia de nucleótidos se determinó que el segmento de ADNc de 700 pb subclonado contenía un marco de lectura abierto que codificaba 150 aminoácidos que coincidían con numerosos otros péptidos secuenciados que se obtuvieron después de la degradación proteolítica y con CNBr de la β -glucosidasa purificada de *T. reesei*. Por lo tanto, se confirmó que las secuencias clonadas codificaban la proteína β -glucosidasa extracelular de *T. reesei*.

25

La clonación de la versión genómica del gen completo de la β -glucosidasa se llevó a cabo después marcando el fragmento de ADNc de 700 pb de *bgl1* con ³²P usando los métodos de marcado de oligonucleótidos descritos por Sambrook et al., anterior. Esta sonda se usa para identificar una banda de 6,0 kb en una transferencia Southern de ADN genómico de *T. reesei*, digerido con *Hind* III.

30

El ADN genómico de *T. reesei* se prepara para el análisis de transferencia Southern por desproteíniación del ADN genómico, seguida de un tratamiento con la ribonucleasa A. El ADN genómico preparado se corta después con una de entre una diversidad de enzimas de restricción, tales como *Eco* RI, *Hind* III y similares, se corre en un gel, se transfiere según la técnica Southern y se hibrida con el fragmento de ADNc de 700 pb marcado del gen *bgl1*. A partir de este análisis se determinó que *Hind* III era la enzima de restricción a elegir para clonar el gen *bgl1*.

35

A continuación se añade *Hind* III al ADN genómico de la cepa *T. reesei* y se extrae de él el ADN. Se corre una muestra de esta digestión en un gel de agarosa y se fracciona por electroforesis. Después, el gel se transfiere mediante la técnica Southern y se hibrida con la sonda de ADNc de 700 pb. Se identificó una banda de 6,0 kb en la transferencia Southern del ADN genómico digerido con *Hind* III. El ADN genómico restante digerido con *Hind* III se sometió después a una electroforesis en gel preparativa y se eluyó el ADN con un tamaño comprendido en el intervalo de aproximadamente 5,0 kb a 7,0 kb, que se clonó en un vector fagómido y se usó para transformar *E. coli* JM101 para crear una librería. Se puede usar cualquier vector fagómido, como los que se describieron anteriormente, pero se prefiere usar pUC218. Las colonias que se obtuvieron como resultado de la transformación se sometieron después a una hibridación de colonias usando el fragmento de ADNc de 700 pb como sonda para identificar aquellas colonias que contenían el ADN genómico clonado que codifica *bgl1*. Después se recogen las colonias positivas de la transformación y el ADN se aísla de ellas mediante métodos conocidos en la técnica.

40

45

50

El ADN aislado de una colonia positiva de este tipo se digiere después con diversas enzimas de restricción, tanto individualmente como en diferentes combinaciones, y se somete a una electroforesis en gel de agarosa. El patrón de bandas resultante se usa después para construir un mapa de restricción del ADN genómico de 6,0 kb clonado de *T. reesei*. Las enzimas usadas en la digestión incluyen *Eco* RI, *Sst* I, *Kpn* I, *Sma* I, *Bam* HI, *Xho* I, *Bgl* II, *Cla* I, *Xba* I, *Sal* I, *Pst* I, *Sph* I, *Hind* III, *Bal* I, *Pvu* II y similares.

55

El mismo gel se somete después a un análisis mediante la técnica de transferencia Southern usando el mismo ADNc de 700 pb de *bgl1* como sonda para identificar los fragmentos de restricción genómicos que comparten homología con el ADNc de *bgl1*. Puesto que la posición de estos fragmentos homólogos se puede determinar respecto al mapa de restricción del fragmento genómico de 6,0 kb, y puesto que también

60

el tamaño de la proteína β -glucosidasa (74 kd) indica una longitud aproximada del gen de 2,1 kb (dado que el peso molecular medio de un aminoácido es de 105 daltons, una proteína de 74 kd contiene como media 705 aminoácidos, lo que a su vez equivale a 2.115 pb), los experimentos de mapeo confirmaron que el clon genómico *Hind* III contiene el gen *bgl1* completo.

5

Los fragmentos de restricción *Pvu* II y *Bal* I, cuyo tamaño oscilaba entre 600 pb y 1500 pb, hibridaron con el clon de ADNc de 700 pb de *bgl1* y, por tanto, se seleccionaron para la subclonación en fagómidos pUC218. La secuencia de nucleótidos se determinó usando los métodos de Sanger et al., descritos anteriormente. Se secuenciaron los subclones *Pvu* II y *Bal* I y se alinearon las secuencias solapantes de los subclones hasta que se obtuvo una única secuencia contigua de un total de 3033 pb, dentro de la cual se determinó la secuencia de nucleótidos del gen *bgl1* en ambas cadenas y se dedujo la posición de dos pequeños intrones por homología con los intrones de otros genes de hongos filamentosos. También se dedujo la secuencia de aminoácidos, como se expone en la Figura 1.

10

En la Figura 1 se expone la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos primaria deducida del gen *bgl1* completo de *T. reesei*. El peso molecular previsto de la proteína β -glucosidasa codificada es de 74.341. Un péptido de 31 aminoácidos precede al extremo amino terminal maduro de la β -glucosidasa, como se deduce de la secuencia del péptido amino terminal. Dentro de este péptido hay tres posibles sitios de reconocimiento de señal para la peptidasa, que constan de Ala-X-Ala.

15

20

La secuencia de aminoácidos primaria de la β -glucosidasa muestra 7 posibles sitios de N-glicosilación en las posiciones 208, 310, 417 y 566, que muestran la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr-X en la que X no es una prolina. Sin embargo, los sitios en las posiciones 45, 566 y 658 presentan un residuo de prolina en la secuencia consenso y pueden o no estar glicosilados.

25

No se observa ningún sesgo de codones poco común en el gen *bgl1* cuando se compara con otros genes de celulasa. La región codificante de *bgl1* está interrumpida por dos intrones cortos de 70 pb y 64 pb, respectivamente. Ambos intrones tienen un sitio donador de ajuste, un sitio aceptor de ajuste y sitios aceptores de ramificaciones para el lazo que muestran homología con las señales de ajuste consenso que aparecen en *T. reesei* y otros hongos filamentosos.

30

Puesto que el gen *bgl1* de la cepa *T. reesei* se ha identificado y se puede clonar, la siguiente etapa es producir un transformante que tenga copias adicionales del gen *bgl1*.

35

En primer lugar se ha de elegir un marcador seleccionable para permitir así la detección del hongo filamentoso transformado. Se pueden usar diferentes marcadores seleccionables que incluyen *argB* de *A. nidulans* o *T. reesei*, *amdS* de *A. nidulans*, *pyr4* de *Neurospora crassa*, *A. nidulans* o *T. reesei* y *pyrG* de *Aspergillus niger*. El marcador seleccionable puede proceder de un gen que especifica un nuevo fenotipo, tal como la capacidad de utilizar un metabolito que normalmente no es metabolizado por los hongos filamentosos que se van a transformar o la capacidad de resistir los efectos de choque tóxicos de un agente químico o de un antibiótico. En la presente invención también se contemplan los marcadores genéticos sintéticos que se pueden sintetizar mediante métodos conocidos en la técnica. Los transformantes se pueden seleccionar después en función del marcador seleccionable introducido en ellos. Puesto que *T. reesei* no contiene el gen *amdS*, se prefiere usar el gen *amdS* en *T. reesei* como marcador seleccionable que codifica la enzima acetamidasa que permite a las células transformadas crecer en acetamida como fuente de nitrógeno. En el caso en que el gen *bgl1* está delecionado en *T. reesei*, se prefiere usar el gen *pyrG* como marcador seleccionable.

40

45

La cepa huésped usada debe ser un mutante de hongo filamentoso que presente un gen o genes no funcionales correspondientes al marcador seleccionable elegido, o que carezca de ellos. Por ejemplo, si se usa el marcador seleccionable de *argB*, se usa una cepa mutante *arg*⁻ específica como receptor en el procedimiento de transformación. Otros ejemplos de marcadores seleccionables que se pueden usar en la presente invención incluyen los genes *trp*, *pyr4*, *pyrG*, *trp1*, *oliC31*, *Bm1*, *pkiA*, *niaD*, *leu* y similares. Por lo tanto, la cepa receptora correspondiente debe ser una cepa mutante tal como *trp*⁻, *pyr*⁻, *leu*⁻ y similares.

50

55

La cepa mutante proviene de una cepa huésped inicial que es cualquier cepa de hongo filamentoso. Sin embargo, se prefiere usar una cepa mutante superproductora de hongo filamentoso y, concretamente, una cepa superproductora de *T. reesei* antes descrita, puesto que esta cepa secreta grandes cantidades de proteínas y, concretamente, grandes cantidades de enzimas celulasas. La cepa mutante seleccionada se usa después en el proceso de transformación. La cepa preferida de *T. reesei* para uso en la deleción del gen *bgl1* es RLP37 *pyrG69*, un auxótrofo de uridina.

60

La cepa mutante del hongo filamentoso seleccionado se puede preparar mediante numerosas técnicas conocidas en la técnica, tales como la técnica de enriquecimiento por filtración descrita por Nevalainen en "Genetic improvement of enzyme production in industrially important fungal strains", Technical Research Center of Finland, Publications 26 (1985). Otra técnica para obtener la cepa mutante consiste en identificar los mutantes en diferentes condiciones del medio de crecimiento. Por ejemplo, los mutantes *arg⁻* se pueden identificar usando una serie de placas mínimas provistas de diferentes intermedios de la biosíntesis de arginina. Otro ejemplo es la producción de cepas mutantes *pyr⁻* sometiendo las cepas a ácido fluoroorótico (FOA). Las cepas con un gen *pyr4* intacto crecen en un medio con uridina y son sensibles a ácido fluoroorótico, y, por lo tanto, es posible seleccionar las cepas mutantes *pyr4⁻* seleccionando respecto a la resistencia a FOA.

El marcador seleccionable elegido se clona después en un plásmido adecuado. En la presente invención se puede usar cualquier plásmido para la clonación del marcador seleccionable, tal como pUC18, pBR322 y similares. Sin embargo, se prefiere usar pUC100. El vector se crea por digestión de pUC100 con la enzima de restricción *Sma*I, y los grupos fosfato 5' se eliminan después por digestión con fosfatasa alcalina de ternero. El vector fragmentado se purifica después mediante electroforesis en gel, a la que sigue una electroelución del trozo de gel aislado. El gen *amdS* de *A. nidulans* se aísla en forma de un fragmento de restricción *Sst*I de 2,4 kb después de separar las secuencias del vector mediante procedimientos conocidos, como los descritos por Hynes et al., *Mol. Cell. Biol.*, 3, páginas 1430-1439 (1983). A continuación, el fragmento *Sst*I de *amdS* de 2,4 kb y el fragmento del vector pUC100 de 2,7 kb se ligan, y la mezcla de ligación se introduce después en la cepa huésped JM101 de *E. coli*.

En la presente invención se puede usar cualquier plásmido para la inserción del gen *bgl1*, pero se prefiere usar el plásmido pSAS.

pSAS β -glu se construye mediante la digestión de pSAS con la enzima de restricción *Hind* III y la purificación del fragmento lineal por electroforesis en gel y electroelución. En este fragmento del vector pSAS tratado con *Hind* III se liga el fragmento *Hind* III de 6,0 kb del ADN genómico de *T. reesei* que contenía toda la región codificante del gen *bgl1* junto con las secuencias necesarias para la transcripción y traducción. La Figura 2 ilustra la construcción de pSAS β -glu.

También es posible construir vectores que contienen al menos una copia adicional del gen *bgl1* y construir vectores en los que la secuencia de aminoácidos del gen *bgl1* se ha alterado mediante técnicas conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida, métodos de PCR y métodos de mutación químicos.

Una vez construido un vector adecuado, éste se usa para transformar cepas de hongos filamentosos. Puesto que la permeabilidad de la pared celular en los hongos filamentosos (por ejemplo, *T. reesei*) es muy baja, la captación de la secuencia de ADN, del gen o del fragmento génico deseados es, en el mejor de los casos, mínima. Para superar este problema, se puede aumentar la permeabilidad de la pared celular, o el ADN se puede disparar directamente en las células mediante un dispositivo de pistola de partículas. En el dispositivo de pistola de partículas, el ADN que se ha de incorporar en las células se aplica sobre esferas de un tamaño del orden de micrómetros, y estas esferas se disparan literalmente en las células dejando el ADN en ellas y dejando un hueco en la membrana celular. La célula después autorrepara la membrana celular mientras que el ADN permanece incorporado en ella. Además de este método antes descrito, existen numerosos métodos para aumentar la permeabilidad de las paredes celulares de los hongos filamentosos en la cepa mutante (es decir, que carece de un gen funcional correspondiente al marcador seleccionable usado) antes del proceso de transformación.

Uno de estos métodos implica la adición de altas concentraciones de álcali o de iones alcalinos a las células de hongos filamentosos. En la presente invención se puede usar cualquier ion de metal alcalino o de metal alcalinotérreo; sin embargo, se usa preferentemente CaCl_2 o acetato de litio, y más preferentemente se usa acetato de litio. La concentración de álcali o de iones alcalinos puede variar en función del ion usado, y normalmente se usan concentraciones de 0,05 M a 0,4 M. Se prefiere usar una concentración de aproximadamente 0,1 M.

Otro método que se puede usar para inducir la permeabilidad de la pared celular para aumentar la captación de ADN en hongos filamentosos consiste en resuspender las células en un medio de crecimiento suplementado con sorbitol y ADN portador de timo de ternero. Después se añaden esferas de vidrio al medio suplementado y la mezcla se agita en un vortex a alta velocidad durante aproximadamente 30 segundos. Este tratamiento rompe las paredes celulares, pero puede matar a muchas de las células.

Otro método más para preparar los hongos filamentosos para la transformación implica la preparación de protoplastos. El micelio fúngico es una fuente de protoplastos, de modo que se puede aislar el micelio de las células. Las preparaciones de protoplastos se protegen después por medio de la presencia de un estabilizador osmótico en el medio de suspensión. Estos estabilizadores incluyen sorbitol, manitol, 5 cloruro sódico, sulfato de magnesio y similares. Normalmente, la concentración de estos estabilizadores varía entre 0,8 M y 1,2 M. Se prefiere usar una solución aproximadamente 1,2 M de sorbitol en el medio de suspensión.

La captación del ADN por parte de la cepa huésped mutante de hongo filamentosos depende de la concentración de ion calcio. En general se usa en una solución de captación CaCl_2 entre aproximadamente 10 mM y 50 mM. Aparte de la necesidad de iones calcio en la solución de captación, otros componentes incluidos generalmente son un sistema tamponante, tal como tampón TE (Tris 10 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM) o tampón MOPS 10 mM, pH 6,0 (ácido morfolinopropano-sulfónico), y polietilenglicol (PEG). El polietilenglicol actúa en la fusión de las membranas celulares, permitiendo así que el contenido del micelio se libere en el citoplasma de la cepa mutante de hongo filamentosos, y el ADN plasmídico se transfiere al núcleo. Esta fusión con frecuencia deja múltiples copias del ADN plasmídico integradas en tándem en el cromosoma del huésped. En general, se usa una alta concentración de PEG en la solución de captación. Se pueden usar en la solución de captación hasta 10 volúmenes de PEG 4000 al 25%. Sin embargo, es preferible añadir aproximadamente 4 volúmenes a la solución de captación. También se pueden añadir 20 a la solución de captación aditivos tales como dimetilsulfóxido, heparina espermidina, cloruro potásico y similares, que contribuyen a la transformación.

Normalmente se usa en la transformación una suspensión que contiene las células mutantes de hongo filamentosos que se han sometido a un tratamiento de permeabilización o los protoplastos en una densidad de 10^8 a 10^9 /ml, preferentemente de 2×10^8 /ml. Estos protoplastos o células se añaden a la solución de captación junto con el vector de transformación deseado que contiene un marcador seleccionable y otros genes de interés, para formar una mezcla de transformación.

La mezcla se incuba después a 4°C durante un periodo de 10 a 30 minutos. A continuación se añade PEG adicional a la solución de captación para potenciar adicionalmente la captación del gen o de la secuencia de ADN deseados. El PEG se puede añadir en volúmenes de hasta 10 veces el volumen de la mezcla de transformación, preferentemente alrededor de 9 veces. Después de añadir el PEG, la mezcla de transformación se incuba a temperatura ambiente antes de añadir una solución de sorbitol y CaCl_2 . La suspensión de protoplastos se añade después a alícuotas fundidas de un medio de crecimiento. Este medio 35 de crecimiento no contiene uridina y sólo permite selectivamente el crecimiento de los transformantes. Las colonias siguientes se transfirieron y purificaron en un medio de crecimiento agotado de sorbitol.

En este estadio, los transformantes estables se pueden distinguir de los transformantes inestables por su mayor tasa de crecimiento y por la formación de colonias circulares con un contorno liso en lugar de irregular en el medio de cultivo sólido. En algunos casos se puede realizar además un ensayo adicional de estabilidad cultivando los transformantes en un medio sólido no selectivo, recogiendo las esporas de este medio de cultivo y determinando el porcentaje de estas esporas que germinarán y crecerán seguidamente en un medio selectivo.

Con el fin de asegurar que la transformación ha tenido lugar mediante los métodos antes descritos, se lleva a cabo un análisis adicional de los transformantes, tal como una transferencia Southern y una autorradiografía. Con el uso de los mismos procedimientos básicos antes expuestos, se puede delecionar el gen *bgl1* completo de un vector y transformar con él cepas de hongo filamentosos, o el gen *bgl1* se puede alterar y transformar en cepas de hongo filamentosos.

Una vez confirmado que las cepas transformadas contienen al menos una copia adicional del gen *bgl1* o de un gen *bgl1* alterado, las cepas se cultivan adicionalmente en condiciones que permiten la propagación de estos transformantes. Después, los transformantes se pueden aislar del medio de cultivo y usar en una diversidad de aplicaciones que se describen a continuación. De forma alternativa, los transformantes se pueden fermentar adicionalmente, y se puede aislar una composición de celulasa fúngica recombinante del medio de cultivo. Puesto que, por ejemplo, los transformantes producidos mediante la presente invención pueden expresar una β -glucosidasa extracelular potenciada o alterada en el medio de fermentación, las composiciones de celulasa fúngica se pueden aislar del medio. Normalmente, el procedimiento de aislamiento implica la centrifugación del medio de cultivo o de fermentación que contiene 60 los transformantes y la filtración del sobrenadante mediante ultrafiltración para obtener una composición de celulasa fúngica producida por recombinación. De forma opcional, se puede añadir adicionalmente un agente antimicrobiano a la composición antes de usarla en la diversidad de aplicaciones descritas

más adelante. Los ejemplos de agentes antimicrobianos que se pueden añadir son azida sódica, benzoato sódico y similares.

Para confirmar que los transformantes producidos mediante el procedimiento de la presente invención presentaban una mayor actividad sobre la celobiosa se realizó el siguiente experimento. En este experimento se hicieron reaccionar 50 mg de celobiosa suspendida en 1,0 ml de tampón fosfato (pH 5,0) con el producto de fermentación producido por el transformante (65,5 mg/ml de proteína), usando un producto de fermentación de una cepa normal no mutante de *T. reesei* como control (135,0 mg/ml de proteína). Los resultados de la actividad sobre la celobiosa en condiciones de velocidad inicial se exponen en la siguiente Tabla I:

TABLA I

Producto	Proteína (mg/ml)	Actividad sobre celobiosa <i>μmol de glucosa</i> mg de proteína
Control	135,0	6
Producto producido mediante la presente invención	65,5	33

Los resultados de este experimento indican que el producto de fermentación producido por los transformantes de la presente invención presentan una actividad específica sobre el sustrato, la celobiosa, más de cinco veces mayor que la cepa control no mutante de *T. reesei*.

Más aún, las Figuras 7 y 8 confirman que la hidrólisis se ve potenciada para los sustratos Avicel y PSC (observación: PSC es una celulosa hinchada en ácido fosfórico obtenida mediante el tratamiento de Avicel con ácido fosfórico) usando enzima/ sustrato al 1,0%. En el experimento, el PSC o Avicel se suspendieron en 2 ml de tampón acetato sódico 50 mM, pH 4,8, y se incubaron a 40° en condiciones no agitadas durante hasta 24 horas. El azúcar reductor soluble se midió mediante el método de Nelson y Somogyi. Estas figuras demuestran, además, que el producto de fermentación con actividad β -glucosidasa recombinante potenciada, producido a partir de los transformantes de acuerdo con la presente invención, presenta una mayor velocidad y extensión de la actividad hidrolítica sobre los diversos sustratos que el control convencional Cyt-123 (como media, un 20% más de actividad). El control Cyt-123 es el producto obtenido a partir de una cepa superproductora de celulasa de *T. reesei* sometida a fermentación a escala industrial.

Los transformantes enriquecidos se pueden usar en una gran cantidad de aplicaciones diferentes. Por ejemplo, algunas β -glucosidasas se pueden aislar posteriormente del medio de cultivo que contiene los transformantes potenciados y añadir a las uvas durante la producción de vino para potenciar el aroma del producto vinícola acabado. Otra aplicación más puede consistir en usar la β -glucosidasa en frutas para potenciar su aroma. De forma alternativa, el producto de fermentación recombinante aislado que contiene la β -glucosidasa potenciada se puede usar directamente en aditivos alimentarios o en el procesamiento del vino para potenciar el sabor y el aroma.

Puesto que la velocidad de hidrólisis de los productos celulósicos aumenta cuando se usan los transformantes con al menos una copia adicional del gen *bgl1* insertada en el genoma, los productos que contienen celulosa o heteroglicanos se pueden degradar a una velocidad mayor y en una mayor medida. Los productos hechos de celulosa, tales como papel, algodón, pañales celulósicos y similares, se pueden degradar más eficientemente en un vertedero. La Figura 9 ilustra el uso de una preparación con actividad β -glucosidasa aumentada, aislada del medio de fermentación que contiene los transformantes con al menos una copia adicional del gen *bgl1* insertada en el genoma, en comparación con un patrón Cyt-123 no potenciado (definido anteriormente) en un producto de pañal celulósico. Este experimento de hidrólisis se realizó usando 0,4 mg del patrón y del producto de fermentación por 100 mg de sustrato (el pañal celulósico). El experimento se llevó a cabo a 50°C durante un periodo de cinco horas, y la concentración de glucosa se midió por duplicado a diferentes intervalos de tiempo. Esta curva ilustra una velocidad de hidrólisis mayor para el producto producido por el producto de fermentación procedente del transformante con copias adicionales de *bgl1* que para el patrón. También se determinó que aproximadamente un

14% de las fibras procedentes del pañal eran insolubles en la solución acuosa. Por lo tanto, el producto de fermentación obtenido a partir de los transformantes, o los transformantes solos, se puede usar en las composiciones para ayudar a degradar por licuefacción una diversidad de productos celulósicos que se añaden a vertederos excesivamente llenos.

5

La sacarificación y fermentación simultáneas es un proceso en el que la celulosa presente en la biomasa se convierte en glucosa y, al mismo tiempo y en el mismo reactor, las cepas de levadura convierten la glucosa en etanol. Las cepas de levadura que se conocen para el uso en este tipo de procesos incluyen *B. clausenii*, *S. cerevisiae*, *Cellulolyticus acidothermophilium*, *C. brassicae*, *C. lustinaniae*, *S. uvarum*, *Schizosaccharomyces pombe* y similares. El etanol obtenido en este proceso se puede usar posteriormente como potenciador de octano, o directamente como combustible en lugar de gasolina, que resulta ventajoso ya que el etanol como fuente de combustible es menos perjudicial para el medio ambiente que los productos derivados del petróleo. Se sabe que el uso de etanol mejora la calidad del aire, y posiblemente reduzca los niveles locales de ozono y la niebla contaminante. Más aún, el uso de etanol en lugar de gasolina puede tener una importancia estratégica al amortiguar el impacto de los cambios repentinos en la energía no renovable y en los suministros petroquímicos.

El etanol se puede producir mediante procesos de sacarificación y fermentación a partir de biomasa celulósica, tal como árboles, plantas herbáceas, desechos sólidos municipales y residuos agrícolas y forestales. Sin embargo, un problema importante que se encuentra en este proceso es la falta de β -glucosidasa en el sistema para convertir la celobiosa en glucosa. Se sabe que la celobiosa actúa como inhibidor de las celobiohidrolasas y endoglucanasas, y de este modo reduce la velocidad de hidrólisis para todo el sistema de celulosa. Por lo tanto, el uso de una mayor actividad β -glucosidasa para convertir la celobiosa rápidamente en glucosa aumentaría enormemente la producción de etanol. Para ilustrar este punto, se comparó la capacidad de la citolasa 123 y del producto de fermentación producido por los transformantes (normalizado respecto a citolasa sobre la base de proteína total) de acuerdo con la presente invención en condiciones de fermentación para hidrolizar fracciones de papel brutas, compuestas por 50 a 60% de materiales celulósicos, procedentes de una fracción fibrosa (RDF) de desechos sólidos municipales (MSW). Tales suspensiones se encontraban en tampón acetato sódico 50 mM, pH 4,8 a 5,0, y se equilibraron a 30°C. Se añadió después a los frascos *Saccharomyces cerevisiae* al 4% y se recogieron muestras periódicamente cada 80 horas. A continuación se midió el rendimiento de la producción de etanol. La siguiente Tabla II ilustra que es posible aumentar la producción de etanol usando la preparación con actividad β -glucosidasa aumentada de la presente invención, usando preparaciones de desechos sólidos municipales como fuente de celulosa.

35

TABLA II

Dosificación	Gramos/litro de etanol	
<i>mg de proteína</i> gramo de celulosa	Citolasa 123	Prep. β -Glu alta
10	2,1	5,0
20	5,3	7,2
30	6,9	8,8
40	8,0	9,3
50	8,5	9,3
60	8,5	9,3

En la Tabla II se puede observar claramente que la preparación con actividad β -glucosidasa potenciada preparada de acuerdo con la presente invención potencia la producción de etanol en comparación con un control de citolasa 123, especialmente a bajas concentraciones de proteína.

60

Las composiciones de detergente de esta invención pueden emplear, además de la composición de celu-

lasa, un tensioactivo, incluidos los tensioactivos aniónicos, no iónicos y anfólicos, una hidrolasa, cargas, blanqueadores, agentes de azulado y tintes fluorescentes, inhibidores de la aglutinación, solubilizadores, tensioactivos catiónicos y similares. Todos estos componentes son conocidos en la técnica de detergentes. Para una discusión más a fondo, véanse la solicitud de Estados Unidos n° de serie 07/593.919, titulada
 5 “*Trichoderma reesei* Containing Deleted Cellulase Genes and Detergent Compositions Containing Cellulases Derived Therefrom”, y la solicitud de Estados Unidos n° de serie 07/770.049, presentada el 4 de octubre de 1991 y titulada “*Trichoderma reesei* Containing Deleted and/or enriched Cellulase and other enzyme Genes and Cellulase Compositions Derived Therefrom”, que se incorporan ambas en la presente memoria como referencia en su totalidad.

10

Las composiciones de detergente contienen niveles aumentados de β -glucosidasa o una β -glucosidasa alterada. A este respecto, realmente depende del tipo de producto que uno desea usar en las composiciones de detergente para proporcionar los efectos apropiados.

15

Preferentemente, las composiciones de celulasa se emplean en cantidades de aproximadamente 0,00005 por ciento en peso a aproximadamente 5 por ciento en peso respecto a la composición de detergente total. Más preferentemente, las composiciones de celulasa se emplean en cantidades de aproximadamente 0,01 por ciento en peso a aproximadamente 5 por ciento en peso respecto a la composición de detergente total y, aún más preferentemente, de aproximadamente 0,05 por ciento en peso a aproximadamente 2 por
 20 ciento en peso respecto a la composición de detergente total.

20

Además, la presente invención también contempla el uso de la secuencia de nucleótidos de la β -glucosidasa de *T. reesei* para diseñar diferentes sondas para la identificación del gen de la β -glucosidasa extracelular en otros hongos filamentosos. A este respecto, se puede usar la secuencia de nucleótidos
 25 completa del gen *bgl1*, o una parte de ella, para identificar y clonar los genes equivalentes de otros hongos filamentosos. Las fuentes de hongos filamentosos incluyen los hongos de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola*, *Penicillium* y similares. Más concretamente, las especies preferidas incluyen *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus phoenicis*,
 30 *Trichoderma koningii* y similares. Debido a la homología del gen *bgl1* entre especies, son fáciles de identificar y clonar los genes equivalentes de hongos filamentosos. Las Figuras 10A y 10B son indicativas de esto e ilustran una autorradiografía del ADN de *A. nidulans* y *N. crassa* (Figura 10A) y de *H. grisea* (Figura 10B) digerido con *Hind* III y *Eco* RI, que después se transfirió e hibridó con un fragmento de ADN *Hind* III de 6,0 kb de *bgl1* marcado con ^{32}P que contiene el gen *bgl1* de *T. reesei*. Estas autorradiografías
 35 ilustran claramente que se puede usar un fragmento de ADN que contiene el gen *bgl1* de *T. reesei* para identificar el gen *bgl1* extracelular en otros hongos.

35

Por tanto, el gen *bgl1* de otros hongos filamentosos se puede clonar mediante los métodos antes descritos, usando el gen *bgl1* de *T. reesei* marcado con ^{32}P como sonda. Una vez que se han clonado los genes
 40 de otros hongos filamentosos, éstos se pueden usar para transformar los hongos filamentosos de los que proviene el gen, u otros hongos filamentosos, para superproducir la β -glucosidasa mediante los métodos antes descritos.

40

Los siguientes ejemplos específicos se proporcionan con el fin de ilustrar adicionalmente la presente invención y sus ventajas, entendiéndose que éstos pretenden ser únicamente ilustrativos y de ningún modo
 45 limitantes.

45

Ejemplo 1

50 Aislamiento del ARN total de *Trichoderma reesei*

Un cultivo de *Trichoderma reesei* superproductor de celulasas se indujo específicamente para la celulasa usando soforosa, un diglucósido β ,1-2, como lo describe Gritzali, 1977. La cepa inicial de *Trichoderma reesei* es una cepa superproductora de celulasa (RL-P37) desarrollada por mutagénesis mediante
 55 los métodos descritos por Sheir-Neiss, G. y Montenecourt, B.S., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 20 (1984), páginas 46-53. Se añadió un inóculo micelial de *T. reesei* procedente de un cultivo en agar de dextrosa de patata (Difco) a 50 ml de medio básico de *Trichoderma* que contenía 1,40 gramos/litro de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 gramos/litro de KH_2PO_4 , 0,30 gramos/litro de MgSO_4 , 0,30 gramos/litro de urea, 7,50 gramos/litro de BactoPeptona, 5,0 ml/litro de Tween - 80 al 10 %, 1,0 ml/litro de elementos traza-EFG,
 60 pH 5,4, y que se filtró a través de un filtro de 0,2 micrómetros en un matraz tabicado de 250 ml. Este cultivo se incubó a 30°C durante 48 horas con agitación vigorosa. Se tomaron alícuotas de cinco mililitros del cultivo y se añadieron a 25 ml de medio básico fresco en siete matraces de 250 ml. Éstas se cultivaron

60

seguidamente durante 24 horas a 30°C. Todos los cultivos se centrifugaron en una centrífuga clínica de sobremesa a 2400 x g durante 10 minutos. Los sedimentos miceliales se lavaron tres veces en 50 ml de tampón KHPO₄ 17 mM (pH 6,0). Por último, los micelios se suspendieron en seis matraces que contenían 50 ml de tampón KHPO₄ 17 mM con la adición de soforosa 1 mM y en un matraz control que no contenía soforosa. Los matraces se incubaron durante 18 horas a 30°C antes de la cosecha por filtración a través de Mira-cloth (Calbiochem). El exceso de medio se eliminó y la estera micelial se colocó directamente en nitrógeno líquido y se puede almacenar a -70°C durante hasta un mes. Las hifas congeladas se molieron después en un molinillo de café eléctrico que se enfrió previamente con unos trozos de hielo seco, hasta que se obtuvo un polvo fino. El polvo se añadió después a aproximadamente 20 ml de un tampón de extracción que contenía 9,6 gramos de ácido p-aminosalicílico disuelto en 80 ml de agua tratada con DEP, 1,6 gramos de ácido triisopropilnaftalenosulfónico disuelto en 80 ml de agua tratada con DEP, 24,2 gramos de Tris-HCl, 14,6 gramos de NaCl, 19,09 gramos de EDTA, que se diluyó a un volumen total de 200 ml con agua tratada con DEP y el pH se ajustó a 8,5 con NaOH. Después de añadir el tampón de extracción, se añadieron también 0,5 volúmenes de fenol saturado con TE y la mezcla de extracción se colocó en hielo. A continuación se añadió un cuarto de volumen de cloroformo a la mezcla de extracción y la mezcla se agitó durante dos minutos. Después se separaron las fases mediante centrifugación a 2500 rpm. La fase acuosa se eliminó y se colocó en un tubo de centrífuga que contenía unas gotas de fenol en el fondo de dicho tubo. El tubo se colocó en hielo. La fase orgánica se reextrajo después con 2,0 ml de tampón de extracción y se colocó durante 5 minutos en un baño de agua a 68°C para liberar el ARN atrapado en los polisomas y en la interfase de la mezcla de extracción. La mezcla extraída se centrifugó, y la fase acuosa se eliminó y combinó con la otra fracción acuosa.

A continuación se extrajeron todas las fracciones acuosas 4 a 5 veces con fenol-cloroformo (1:1 v/v) hasta que ya no se veía proteína en la interfase. Después se añadieron a los extractos orgánicos 0,1 volumen de acetato sódico 3 M, pH 5,2 (hecho con agua DEP y autoclavado) y 2,5 volúmenes de 95 % y los extractos se congelaron a -20°C durante 2 a 3 horas. De forma alternativa, se precipitó el ARN usando acetato de litio 2 M. El ARN se sedimentó después por centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos. El ARN sedimentado se resuspendió después en agua DEP con un inhibidor de la RNasa a una concentración final de 1 unidad por μ l. Para determinar si los genes que codifican las enzimas se estaban induciendo, se analizó el ARN total.

Análisis de la preparación de ARN total

Para confirmar si los genes que codifican las enzimas del complejo de celulasa se estaban induciendo, se analizó el ARN total mediante la técnica de transferencia Northern descrita por Sambrook et al., anterior, usando un fragmento ³²P del gen *cbh2* de *T. reesei* como sonda. El clon *cbh2* se aisló usando los métodos descritos por Chen et al. en "Nucleotide Sequence and Deduced Primary Structure of Cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*", *Biotechnology*, vol. 5 (marzo 1987), incorporado en la presente memoria como referencia. Se realizó una mutagénesis dirigida (Sambrook et al., anterior) en el clon *cbh2* y se introdujo un sitio *Bgl* II en el extremo 5' exacto del marco de lectura abierto y un sitio *Nhe* I en el extremo 3' exacto. La secuencia codificante de *Bgl* II/*Nhe* I se clonó después en un fagómido pUC218. Para usarlo como sonda, el fragmento *cbh2* se digirió con *Bgl* II/*Nhe* I y se aisló mediante electroforesis en gel. Los resultados indicaron que el nivel de ARNm específico de *cbh2* alcanzó un pico 14 a 18 horas después de la inducción. A continuación se combinó el ARN total de 14, 18 y 22 horas.

Ejemplo 2

Purificación de ARNm poliadenilado

A continuación se aisló el ARNm de la fracción combinada de ARN total antes expuesta usando cromatografía en oligo(dT) celulosa. La oligo(dT) celulosa (tipo 3 de Collaborative Research, Lexington, MA) se equilibró primero con tampón de unión a oligo(dT) que contenía Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, NaCl 0,5 M y EDTA 1 mM, y después se añadieron alícuotas de 25 a 300 mg a tubos de centrífuga de 1,5 ml. Se añadió ARN disuelto en 1 ml de tampón de unión y se dejó que se uniera durante 15 minutos con agitación suave. Las suspensiones se centrifugaron a 1500 g durante 3 a 5 min, se lavaron 3 a 5 veces con 1 ml de tampón de unión y después se lavaron 3 veces con 400 μ l de tampón de elución que contenía Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5, y EDTA 1 mM. Los eluatos se combinaron, se reajustaron a NaCl 0,5 M, se volvieron a unir y se volvieron a eluir con tres lavados de tampón de elución. Los últimos tres lavados con tampón de elución se combinaron y el ARNm se recuperó mediante precipitación con etanol.

Análisis del ARN total y del ARNm poliadenilado

El ARN total y el ARN poliadenilado se fraccionaron en geles de agarosa-formaldehído al 1 % usando 10 μg de ARN para cada carril, se transfirieron a membranas Nytran^R y se analizaron mediante el método de transferencia Northern descrito por Thomas en "Hybridization of denatured RNA and Small DNA fragments transferred to Nitrocellulose", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 77 (1980), páginas 5201-5205.

Brevemente, este procedimiento implica la desnaturalización del ARN (hasta 10 $\mu\text{g}/8 \mu\text{l}$ de reacción) por incubación en glioxal 1 M/ Me₂SO al 50 % (v/v)/ tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7,0, a 50°C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió en hielo y se añadieron 2 μl de tampón de muestra que contenía glicerol al 50 % (v/v), tampón fosfato sódico 10 mM a 7,0 y azul de bromofenol. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles horizontales de formaldehído-agarosa al 1 % en tampón fosfato 10 mM, pH 7,0, a 90 v durante 6 horas.

El ARN glioxilado se transfirió de los geles de agarosa a nitrocelulosa usando NaCl 3 M/ citrato trisódico 0,3 M (20X NaCl/cit). Tras la electroforesis, el gel se colocó sobre dos hojas de papel Whatman 3 MM saturado con 20X NaCl/cit. La membrana Nytran^R se humedeció con agua, se equilibró con 20X NaCl/cit y se colocó sobre el gel. El gel se cubrió después con dos hojas de papel Whatman 3 MM, una capa de 5 a 7 cm de toallitas de papel, una placa de vidrio y un peso. La transferencia del ARN se completó en un plazo de 12 a 15 horas. Las transferencias se secaron después bajo una lámpara y se cocieron al vacío durante 2 h a 80°C.

Las membranas se hibridaron con una sonda de *cbh2* para verificar que la mezcla de ARNm poliadenilado contenía ARNm de *cbh2* y que, por deducción, se indujeron realmente los genes que codifican las enzimas del complejo de celulasa.

Ejemplo 3

*Síntesis de ADNc*A. *Síntesis de la primera cadena*

La síntesis de ADNc se realizó usando el sistema BRL cDNA Synthesis System^R (Bethesda Research Laboratories, Md.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A un tubo estéril tratado con DEPC en hielo se añadieron 10 μl de tampón primera cadena 5X que contenía Tris-HCl 250 mM, pH 8,3, KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM, DTT 50 mM, 2,5 μl de mezcla de dNTP 10 mM (dATP 10 mM, dCTP 10 mM, dGTP 10 mM, dTTP 10 mM), 5 μl de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (0,5 mg/ml), 10 μl de ARNm a 0,5 mg/ml y 20 μl de agua tratada con pirocarbamato de dietilo (DEPC) para crear una composición final que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotreitól 10 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 500 μM cada uno, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de oligo(dT)₁₂₋₁₈, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ARN poliadenilado y 10.000 U/ml de transcriptasa inversa de M-MLV clonada. Asimismo se corrió simultáneamente un ciclo de control usando 10 μl de un ARN control de 2,3 kb (0,5 mg/ml) en lugar del ARNm.

La reacción se inició por adición de 2,5 μl de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Malony (M-MLV) (100 unidades/ μl) al tubo de ARNm y al ARN control. Las muestras se mezclaron. Todos los tubos de reacción se incubaron a 37°C durante una hora y después se colocaron en hielo.

Se corrió una pequeña alícuota de la mezcla de reacción en un gel para confirmar su presencia y su cantidad. El rendimiento obtenido fue de aproximadamente 2 a 6 μg .

B. *Síntesis de la segunda cadena*

Al tubo de control en hielo se añadieron, tras la síntesis de la primera cadena, 230,6 μl de agua tratada con DEPC, 6 μl de mezcla de dNTP 10 mM, 32 μl de tampón segunda cadena 10X que contenía Tris-HCl 188 mM, pH 8,3, KCl 906 mM, (NH₄)₂SO₄ 100 mM, MgCl₂ 46 mM, ditiotreitól 37,5 mM, NAD 1,5 mM, 8 μl de DNA polimerasa I de *E. coli* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 1,4 μl de RNasa H de *E. coli* y 1 μl de DNA ligasa de *E. coli* (100 unidades).

A la muestra de la síntesis de la primera cadena se añadieron en hielo 289,5 μl de agua tratada con DEPC, 7,5 μl de mezcla de dNTP 10 mM, 40 μl de tampón segunda cadena 10X, 10 μl de DNA polimerasa I de *E. coli*, 1,75 μl de RNasa H de *E. coli* y 1,25 de DNA ligasa de *E. coli*, para crear una composición final que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), KCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgCl₂ 5

ES 2 182 818 T3

mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 250 μ M cada uno, NAD 0,15 mM, ditiotreititol 5 mM, 250 U/ml de DNA polimerasa I, 8,5 U/ml de RNasa H y 30 U/ml de DNA ligasa. Tanto el tubo control como el tubo de muestra se agitaron suavemente con vórtex y se incubaron durante 2 horas a 16°C. Tras la incubación, ambos tubos se colocaron en hielo.

5

El tubo de muestra se extrajo después con 415 μ l de fenol y se precipitó con etanol. El sedimento se disolvió en 200 μ l de tampón TE estéril (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, Na₂EDTA 1 mM) y se volvió a precipitar en acetato de amonio 7,5 M con etanol.

10

Posteriormente se analizó una alícuota de la muestra mediante electroforesis en gel para comprobar la pureza. El rendimiento de la síntesis fue de aproximadamente 4,0 μ g.

15

La muestra control que queda se extrajo posteriormente con fenol y se precipitó con etanol tal y como se describió anteriormente para la muestra. Tras disolver el sedimento en 200 μ l de tampón TE estéril, precipitar de nuevo la muestra en acetato de amonio con etanol y volver a disolver el sedimento seco en 20 μ l de tampón TE estéril, se analizaron 2 μ l de la solución mediante electroforesis en gel para comprobar la pureza.

Ejemplo 4

20

Amplificación de las secuencias de ADNc de bgl1

25

La amplificación de los fragmentos de ADNc que codifican una parte del gen de la β -glucosidasa de *T. reesei*, *bgl1*, se realizó usando el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la Taq^R polimerasa y un termociclador Cetus Thermal Cycler^R de Perkin Elmer.

30

La mezcla de reacción se obtuvo mezclando 76 μ l de agua desionizada, 10 μ l de una mezcla 10X de tampón que contenía (NH₄)₂SO₄ 166 mM, Tris-HCl 670 mM, pH 8,8, MgCl₂ 67 mM, EDTA 67 μ M, β -mercaptoetanol 10 mM, 10 μ l de dimetilsulfóxido y 1,7 mg/ml de ASB diluida a un volumen total de 1,0 ml con agua desionizada, 8 μ l de 2 dTNPs (cada uno), 1 μ l de cebador oligonucleotídico 5', 1 μ l de cebador oligonucleotídico interno 3', 1,0 μ g de ADNc diluido en 3 μ l de agua desionizada y 1 μ g de Taq^R polimerasa.

35

El método de amplificación consiste en un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de una etapa de alineamiento de dos minutos a 50°C y un ciclo de polimerización de 10 minutos a 65°C, durante 30 ciclos adicionales.

A. Cebadores oligonucleotídicos

40

Los cebadores oligonucleotídicos usados para amplificar el fragmento de ADNc que codifica el gen *bgl1* de *T. reesei* se diseñaron en base a la degeneración del código genético para los aminoácidos seleccionados para una región N terminal del gen *bgl1* y para un oligonucleótido interno. El cebador oligonucleotídico 5' constaba de la secuencia:

45

5' GCI GTI CCT CCT GCI GG 3'

en la que I = inosina.

50

El cebador oligonucleotídico 3' interno constaba de una mezcla de 16 x 21 oligonucleótidos. Esta mezcla se basaba en diferentes derivaciones de las secuencias siguientes:

5' GTT G/ATT ICC G/ATT G/AAA G/ATC TGT 3'

55

Ejemplo 5

Subclonación de los fragmentos generados por PCR

60

Se fraccionaron 90 μ l de cada mezcla de reacción en geles de poliacrilamida al 4% en TBE 1X, la banda principal se escindió y se eluyó del trozo de gel tal y como lo describió Sambrook et al., anterior. El fragmento de ADN eluido se precipitó en etanol y se resuspendió en 15 μ l de tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). Cada fragmento de ADN de 1 a 2 μ g se trató después con ATP 0,5 mM y polinucleótido quinasa de T₄ para fosforilar el extremo 5' de cada fragmento siguiendo los procedimientos de Sambrook

ES 2 182 818 T3

et al., anterior. Se generaron extremos romos añadiendo 3 μ l de tampón polimerasa de T₄ 10X (Tris-acetato 330 mM a pH 7,9, acetato de potasio 660 mM, acetato de magnesio 100 mM, 1 μ l de dNTPs 2,5 mM, 1 μ l de DNA polimerasa de T₄ y 5 μ l de agua destilada). La mezcla de reacción de extremos romos se incubó después a 37°C durante 60 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de EDTA a una concentración final de EDTA 1 mM, y la muestra se calentó posteriormente durante 10 minutos a 65°C.

Los fragmentos de ADN de extremos romos se ligaron a continuación con pUC218 desfosforilado y cortado con *Sma*I que había sido infectado con M13X07 tal y como lo describió Sambrook et al., anterior. Los vectores de clonación pUC218 y pUC219 se derivaron de pUC118 y pUC119 por inserción de los policonectores *Bgl* II, *Cla* I y *Xho* I como lo describió Korman et al. en "Cloning, Characterization, and expression of two α -amylase genes from *Aspergillus niger* var. *awamori*", *Current Genetics*, vol. 17, páginas 203-212, (1990).

Se usó después el fagómido antes descrito para transformar la cepa JM101 de *E. coli* tal y como lo describió Yarnisch et al. en "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 y pUC19 Vectors", *Gene*, vol. 1197, páginas 103-119 (1985).

Ejemplo 6

20 *Aislamiento del fragmento de ADNc subclonado*

La cepa transformada se inoculó en 1,5 ml de caldo 2YT en un tubo que había sido inoculado previamente con 15 μ l de JM101 saturado de *E. coli*. El cultivo se creció durante 8 horas a 37°C bajo agitación.

25 La mezcla de cultivo se centrifugó después a 6000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se vertió en otro tubo. Al sobrenadante se añadieron 300 μ l de NaCl 2,5 M, PEG al 20 %, y la solución se mezcló. La mezcla se incubó a continuación a temperatura ambiente durante 15 minutos.

30 La solución se centrifugó después durante 5 minutos en una microcentrífuga y el sobrenadante se eliminó por aspiración. La solución se agitó de nuevo en un vórtex y el sobrenadante se volvió a eliminar por aspiración.

35 Se añadieron al tubo 100 μ l de fenol equilibrado y el tubo se agitó en un vórtex. Se añadieron 100 μ l de cloroformo y el tubo se volvió a agitar en un vórtex. El tubo se calentó a 55°C durante 5 minutos, se mezcló y se centrifugó otros 5 minutos.

40 A continuación se recogieron con pipeta 160 μ l del sobrenadante y se transfirieron a un tubo transparente. Se añadieron al sobrenadante 20 μ l de NaOAc 1 N, pH 4,5, y 400 μ l de EtOH al 95 %, y la solución se mezcló y congeló en hielo seco durante 5 minutos. El tubo se centrifugó después durante otros 15 minutos y el sobrenadante se eliminó por aspiración.

45 Se añadieron al tubo 1.000 μ l de etanol al 70 %, y el tubo se centrifugó durante otros 2 minutos y se volvió a aspirar. La mezcla se centrifugó una vez más al vacío durante 4 minutos y el sedimento se resuspendió en 15 μ l de tampón TE.

Ejemplo 7

Determinación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 700 pb

50 La secuencia de nucleótidos del fragmento de ADNc de 700 pb se determinó usando el método del didesoxinucleótido de secuenciación de ADN descrito por Sanger et al., "DNA Sequencing with chain terminating inhibitors", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 74 (1977), página 5463, usando el conjunto de reactivos Sequenase^R (U.S. Biochemicals).

55 Ejemplo 8

Análisis del gen bgl1

A. *Análisis de secuencia*

60 Se realizó una secuenciación de nucleótidos mediante el método de terminación de cadena con didesoxinucleótido de Sanger et al. (1977) usando el conjunto de reactivos Sequenase^R (U.S. Biochemicals).

B. Secuenciación de aminoácidos

Una muestra de 2,5 nmoles de la preparación de β -glucosidasa reducida y carboximetilada, purificada (según Chirico y Brown, European Journal of Biochem., vol. 165, páginas 333 en adelante) se sometió a una secuenciación del extremo N terminal en un secuenciador multifásico patentado.

A una muestra de β -glucosidasa se añadió la Endo-Lys C proteasa a un 1% de proteína total y la mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C, o la muestra de proteína se sometió a un tratamiento con bromuro de cianógeno. Se añadió un volumen igual de solución A de HPLC (TEA al 0,05%/TFA al 0,05% en agua) para detener la reacción. Los fragmentos de CNBr y Endo-Lys C resultantes se separaron por cromatografía en una columna Brownlee C-4 usando un gradiente lineal de 0-100% de solución B de HPLC (TEA al 0,05%/TFA al 0,05% en n-propanol) a una velocidad de 1% por minuto. Se recogieron varios picos para la secuenciación de aminoácidos, y los datos se indican en la Fig. 1.

Ejemplo 9

Identificación del gen *bgl1* de *T. reesei*

El fragmento de ADNc de 700 pb de *bgl1* se marcó después con ^{32}P usando los métodos descritos por Sambrook et al., anterior.

El ADN genómico de *T. reesei* se preparó mediante filtración de un cultivo de 24 a 36 horas de *T. reesei* a través de Miracloth y congelación de los micelios obtenidos a partir del medio de cultivo. Los micelios congelados se molieron después a polvo fino, y a los micelios en polvo se añadieron 22 ml de TE y 4 ml de SDS al 20% y se mezclaron. Se añadieron a la mezcla 10 ml de fenol y cloroformo antes de centrifugarla y eliminar la fase acuosa. Se añadieron al extracto orgánico 200 μl de proteinasa K a 5 mg/ml y la mezcla se incubó durante 20 minutos a 55°C. El ADN se extrajo posteriormente mediante métodos conocidos en la técnica, usando una extracción con cloroformo/fenol seguida de una precipitación con etanol. El ADN aislado se trató después con 1 μg de ribonucleasa A calentada (100°C durante 15 minutos) por 20 μg de ADN genómico en tampón TE a 37°C durante 30 minutos y luego se enfrió a temperatura ambiente. El ADN genómico de *T. reesei* se cortó con una única o una combinación de varias enzimas de restricción, tales como *Eco* RI, *Hind* III y similares, se realizó una transferencia Southern y se hibridó con el fragmento de ADNc de 700 pb marcado con ^{32}P del gen *bgl1* como sonda. A partir de este análisis se determinó que *Hind* III era la enzima de restricción a elegir para localizar el gen de la β -glucosidasa.

Se añadieron al ADN 10 a 20 unidades de *Hind* III por miligramo de ADN genómico y después se extrajo el ADN con fenol-cloroformo para eliminar las proteínas. El ADN tratado se precipitó después con alcohol y se resuspendió en tampón TE a 2 gramos/litro.

Se cargaron en un gel de agarosa al 1% muestras de 4 μl procedentes de la digestión del ADN genómico con *Hind* III y se fraccionaron por electroforesis. El gel se sometió después a una transferencia Southern y se hibridó con la sonda de ADNc de 700 pb marcada con ^{32}P . Se identificó una banda de 6,0 kb en la transferencia Southern del ADN genómico de *T. reesei*, digerido con *Hind* III.

El ADN genómico *Hind* III restante se sometió a continuación a una electroforesis en gel preparativa y los fragmentos de 5 kb a 7 kb se electroeluyeron del gel de agarosa y se clonaron en pUC218 digerido con *Hind* III. Los plásmidos resultantes se usaron para transformar JM101 de *E. coli* para crear una librería. A continuación, la librería se cribó mediante hibridación de colonias usando el ADNc de 700 pb de *bgl1* marcado con ^{32}P como sonda para identificar aquellas colonias que contenían el ADN que codifica el gen *bgl1*.

Se recogieron las colonias positivas de la transformación y se aisló de ellas el ADN mediante extracción con fenol:cloroformo y precipitación con etanol, descrito por Sambrook et al., anterior.

El ADN aislado de las colonias positivas se digirió tanto con una sola como con diferentes combinaciones de las siguientes enzimas de restricción: *Hind* III, *Eco* RI, *Sst* I, *Kpn* I, *Bam* HI, *Xho* I, *Bgl* II, *Cla* I, *Xba* I, *Sal* I, *Pst* I, *Sph* I, *Bal* I y *Pvu* II. Las digestiones se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa y el patrón de bandas resultante se usó para construir un mapa de restricción del ADN genómico de 6,0 kb clonado. El mismo gel de agarosa se sometió a una transferencia Southern y se hibridó con el ADNc de 700 pb de *bgl1* marcado con ^{32}P para identificar cuál de los fragmentos de restricción

genómicos compartía homología con el ADNc de *bgl1*. Los experimentos de mapeo confirmaron que el gen *bgl1* completo está contenido en el clon genómico *Hind* III. Los fragmentos de restricción *Pvu* II y *Bal* I, cuyo tamaño oscilaba entre 600 pb y 1500 pb, hibridaron con el clon de ADN de 700 pb de *bgl1* y se eligieron para la subclonación en el fagómido pUC218. Después de clonar estos fragmentos en el fagómido, los subclones *Pvu* II y *Bal* I se secuenciaron usando el método de terminación de cadena con didesoxinucleótido de Sanger et al. (1977). En esta secuenciación se determinó que las secuencias solapantes de los subclones se alineaban con una única secuencia contigua de un total de 3033 pb, en la que se determinó la secuencia de nucleótidos en ambas cadenas.

10 Ejemplo 10

Construcción de pSAS β -glu

El vector de partida para la construcción de pSAS β -glu fue el plásmido pSAS. El pSAS se construyó de la siguiente manera. Se digirió pUC100 (un vector plasmídico disponible en el mercado) con la enzima de restricción *Sma*I y los grupos fosfato 5' se eliminaron a continuación por digestión con fosfatasa alcalina de intestino de ternero. El fragmento de vector lineal se purificó del vector no digerido y de proteína mediante electroforesis en gel de agarosa, seguida del aislamiento del ADN del vector lineal a partir del trozo de gel aislado mediante electroelución. Se aisló el gen *amdS* en forma de un fragmento de restricción *Sst*I de 2,4 kb después de la separación de las secuencias del vector (contenido en - Hynes, M.J., Corrick, C.M. y King, J.A., "Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations", *Mol. Cell. Biol.*, vol. 3 (1983), páginas 1430-1439). A continuación se ligaron el fragmento *Sst*I de 2,4 kb de *amdS* y el fragmento de 2,7 kb del vector pUC100 (Sambrook et al., anterior) y la mezcla de ligación se transformó y propagó en la cepa huésped JM101 de *E. coli*.

El pSAS β -glu se construyó por digestión de pSAS con la enzima de restricción *Hind* III y por purificación del fragmento lineal como se describió anteriormente. En este fragmento del vector pSAS tratado con *Hind* III se ligó un fragmento *Hind* III de 6,0 kb del ADN genómico de *T. reesei* que contenía toda la región codificante del gen *bgl1* junto con las secuencias necesarias para la transcripción y traducción de los genes.

Ejemplo 11

35 *Preparación del vector de delección BGL1*

El vector de sustitución de genes pUC $\Delta\beta$ -Glu A/R pyr, ilustrado en la Figura 3B, se construyó clonando un fragmento *Hind* III genómico de 6,0 kb, que se sabía contenía el gen *bgl1* completo, en el policonector de pUC218 que se había cortado con *Hind* III y cuyos extremos se habían desfosforilado con fosfatasa alcalina de intestino de ternero. La región codificante para el gen *bgl1* se eliminó después de este plásmido digiriendo el plásmido con *Apa*I y *Eco* RV en sitios de restricción *Apa*I y *Eco* RV únicos, situados muy en los extremos 5' y 3' del marco de lectura abierto de *bgl1*, y aislando el ADN plasmídico lineal. Los extremos de los sitios de restricción se hicieron romos con la DNA polimerasa de T4. Este plásmido se ligó después con un fragmento de restricción *Hind*III/*Bam* HI aislado de 2412 pb que contenía el gen *pyrG* de *Aspergillus niger* (Hartingsreldt et al., *Mol. Gen. Genet.* 206: 71-75 (1987)), en el que los extremos de restricción se hicieron romos mediante el tratamiento con la DNA polimerasa de T4 para crear el pUC $\Delta\beta$ Glu A/R pyr (Fig. 3B).

Ejemplo 12

50 *Aislamiento de protoplastos*

El micelio se obtuvo inoculando 100 ml de YEG (extracto de levadura al 0,5%, glucosa al 2%) en un matraz de 500 ml con aproximadamente 5×10^7 células de *T. reesei*. El matraz se incubó después a 37°C con agitación durante aproximadamente 16 horas. El micelio se recogió por centrifugación a 2.750 x g. El micelio recogido se lavó posteriormente en una solución de sorbitol 1,2 M y se resuspendió en 40 ml de Novozym^R, que es el nombre comercial de Novo Biolabs, Danbury, Ct., para un sistema enzimático de múltiples componentes que contiene 1,3-alfa-glucanasa, 1,3-beta-glucanasa, laminarinasa, xilanasas, quitinasa y proteasa, solución que contiene 5 mg/ml de Novozym^R 234; 5 mg/ml de MgSO₄·7H₂O; 0,5 mg/ml de albúmina de suero bovino; sorbitol 1,2 M. Los protoplastos se liberaron de restos celulares por filtración a través de Miracloth (Calbiochem Corp.) y se recogieron por centrifugación a 2.000 x g. Los protoplastos se lavaron tres veces en sorbitol 1,2 M y una vez en sorbitol 1,2 M, CaCl₂ 50 mM, se

centrifugaron y se resuspendieron. Los protoplastos se resuspendieron finalmente a una densidad de 2×10^8 protoplastos por ml de sorbitol 1,2 M, CaCl_2 50 mM.

Ejemplo 13

5

Transformación de protoplastos fúngicos con pSAS β -glu

Se añadieron 200 μl de la suspensión de protoplastos preparada en el ejemplo 12 a 20 μl (20 μg) de pSAS β -glu en tampón TE (Tris 10 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM) y 50 μl de una solución de polietilenglicol (PEG) que contenía PEG 4000 al 25%, KCl 0,6 M y CaCl_2 50 mM. Esta mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. Tras este periodo de incubación, se añadieron 2,0 ml de la solución de PEG identificada anteriormente, la solución se mezcló adicionalmente y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de esta segunda incubación se añadieron 4,0 ml de una solución que contenía sorbitol 1,2 M y CaCl_2 50 mM, y esta solución se mezcló adicionalmente. La solución de protoplastos se añadió inmediatamente a alícuotas fundidas de medio N de Vogel (3 gramos de citrato sódico, 5 gramos de KH_2PO_4 , 2 gramos de NH_4NO_3 , 0,2 gramos de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 gramos de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 μg de α -biotina, 5 mg de ácido cítrico, 5 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50 μg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ que contiene adicionalmente glucosa al 1%, sorbitol 1,2 M y agarosa al 1%). La mezcla de protoplastos/ medio se vertió después sobre un medio sólido que contenía el mismo medio de Vogel que se indicó anteriormente pero que contenía adicionalmente acetamida como fuente de nitrógeno. Puesto que *T. reesei* no contiene un equivalente funcional del gen *amdS*, crecerán en este medio sólo los transformantes. Estas colonias se transfirieron y purificaron seguidamente en un medio N de Vogel sólido que contenía como aditivo un 1% de glucosa. La cepa transformada con el gen *bgl1* insertado se denomina A83pSAS β Glu.

25

Los transformantes estables se pueden distinguir de los transformantes inestables por su mayor tasa de crecimiento y por la formación de colonias circulares con un contorno liso en lugar de irregular en el medio de cultivo sólido. En algunos casos se puede realizar además un ensayo adicional de estabilidad cultivando los transformantes en un medio sólido no selectivo, recogiendo las esporas de este medio de cultivo y determinando el porcentaje de estas esporas que germinarán y crecerán seguidamente en un medio selectivo.

30

La Figura 6 es una autorradiografía de una transferencia Southern en la que se usa el fragmento de 700 pb marcado con ^{32}P como sonda, de los diferentes transformantes con más copias del gen *bgl1* (carriles 1 a 8), usando ADN genómico de *T. reesei* de una cepa superproductora digerida con *Hind* III como control (carril 9). Esta autorradiografía muestra claramente que los transformantes contenían una mayor cantidad del gen *bgl1* en comparación con el control.

35

La Figura 4 es una autorradiografía de una transferencia Northern de ARN aislado de una de las cepas transformadas (carril A) producidas por la presente invención después de la inducción con sofrosa, que ilustra un aumento correspondiente de los niveles de mensajero de *bgl1* en comparación con la cepa parental de *T. reesei* (carril B).

40

Aparte del análisis visual de los transformantes, el análisis cuantitativo también se completó cortando las bandas apropiadas de la membrana Nytran^R y contando la radiactividad presente en ellas en un contador de centelleo. Este experimento se llevó a cabo para obtener un cálculo más preciso de las cantidades relativas de mensajero, como se muestra en la siguiente Tabla III:

45

TABLA III

50

CPM	Cepa de <i>Trichoderma reesei</i> parental	Cepa de <i>Trichoderma reesei</i> transformada
CPM mensajero β -glu	14,4	25,4
CPM CBHII	227,1	95,2
CPM β -glu/CBHII	0,0634	0,2668

55

60

La Tabla III ilustra que el transformante producido mediante el procedimiento de la presente invención presenta ARNm de β -glucosidasa adicional y, por tanto, un aumento de la enzima β -glucosidasa que da

como resultado un aumento de la actividad específica.

Ejemplo 14

5 Transformación de protoplastos fúngicos con *pUCΔβGlu A/R pyr4*

Los mutantes de *T. reesei* que carecen de la secuencia codificante para el gen de la β-glucosidasa extracelular, *bgl1*, se obtuvieron mediante un acontecimiento dirigido de sustitución de genes. El plásmido *pUCΔβGlu A/R pyr* se digirió con *Hind* III para obtener un fragmento *Hind* III lineal en el que las secuencias codificantes de *bgl1* se sustituyeron por el gen *pyrG* de *Aspergillus niger*. Los protoplastos se transformaron con el fragmento de ADN lineal que contenía las secuencias flanqueantes de *bgl1* y *pyr4* mediante los métodos de los ejemplos 12 y 13. Tras la transformación, la solución de protoplastos se añadió a alícuotas fundidas del medio N de Vogel que contenía adicionalmente glucosa al 1%, sorbitol 1,2 M y agarosa al 1%. La mezcla de protoplastos/ medio se vertió después sobre un medio sólido que contenía el mismo medio N de Vogel. El medio carecía de uridina y, por lo tanto, sólo las colonias transformadas eran capaces de crecer como resultado de la complementación de la mutación *pyr4* de la cepa RL-P37 de *T. reesei* con el gen *pyr4* silvestre insertado en el fragmento de ADN. Los transformantes estables se seleccionaron después mediante el método mencionado en el ejemplo 13.

20 Ejemplo 15

Análisis de los transformantes

Los transformantes se analizaron en cuanto a la presencia o ausencia del gen *bgl1* usando la sonda de ADNc de 700 pb antes mencionada. Los transformantes se digirieron usando *Hind* III. El ADN genómico total de los transformantes seleccionados se digirió con la enzima de restricción *Hind* III, se corrió en un gel de agarosa al 1%, se transfirió a una membrana Nytran^R y se hibridó con el ADNc de 700 pb marcado con ³²P, antes mencionado, y se visualizó mediante autorradiografía en una película de rayos X. Los resultados de este análisis, expuestos en la Figura 5A, ilustran que los transformantes (Δ12 y Δ36) no contenían una banda correspondiente al gen *bgl1*, mientras que la cepa silvestre (RL-P37, es decir, P-37) sí la contenía.

El ARNm se aisló de los transformantes del ejemplo 14 y se analizó en una transferencia Northern, como en el ejemplo 2. Como se indica en la Figura 5B, el análisis mediante la técnica de transferencia Northern usando la sonda *ApaI/EcoRV* de 2,2 kb de *bgl1* marcada con ³²P, indicó que el ARNm específico de *bgl1* estaba presente en RL-P37 *pyrG69* de *T. reesei* y ausente en los transformantes Δ12 y Δ36.

Las proteínas se recuperaron como en el ejemplo 8 anterior y después se analizaron en cuanto a la presencia de β-glucosidasa mediante el uso de anticuerpos policlonales (de conejos expuestos a β-glucosidasa pura) marcados con peroxidasa de rábano picante para permitir la detección. Los anticuerpos se usaron para identificar la β-glucosidasa pura (100 ng – columna A; 1000 ng – columna B); celulasa producida por *T. reesei* silvestre (columna C); y celulasa producida por una cepa de *T. reesei* genéticamente modificada para delecionar el gen de la β-glucosidasa (columna D). Los resultados de este análisis se exponen en la Figura 5C y muestran que la columna D es la única que no contiene la β-glucosidasa.

Aunque la invención se ha descrito en relación con varias realizaciones preferidas, el experto en la técnica apreciará que se pueden realizar diversas modificaciones, sustituciones, omisiones y cambios sin apartarse de su alcance. Por consiguiente, se pretende que el alcance de la presente invención esté limitado únicamente por el alcance de la reivindicaciones siguientes, incluidos sus equivalentes.

50

55

60

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para modificar la expresión de la β -glucosidasa extracelular en un hongo filamentoso, que comprende transformar dicho hongo con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN fúngico que:
- (a) es capaz de potenciar la expresión de la β -glucosidasa extracelular a través de la presencia de al menos una copia adicional de un gen de β -glucosidasa fúngico; o
- (b) codifica una β -glucosidasa extracelular alterada, es decir, una enzima con una secuencia de aminoácidos que ha sido alterada con respecto a la codificada por el gen *bgl1* procedente de *Trichoderma reesei* por manipulación de dicha secuencia de ADN de *bgl1*.
2. Un procedimiento para potenciar la expresión de la β -glucosidasa extracelular de acuerdo con la reivindicación 1(a), en el que dicho vector de expresión comprende toda la secuencia codificante de un gen de β -glucosidasa fúngico y las secuencias necesarias para la transcripción y traducción del gen de la β -glucosidasa.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho hongo filamentoso se selecciona de los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Neurospora*, *Humicola* y *Penicillium*.
4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho hongo filamentoso es *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus phoenicis*, *Neurospora crassa*, *Humicola grisea*, *Penicillium pinophilum* o *Penicillium oxalicum*.
5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho gen de la β -glucosidasa es un gen *bgl1* procedente de *Trichoderma reesei*.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho gen *bgl1* comprende los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos de 311 a 2679 de la Figura 1.
7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente la etapa de aislamiento de los transformantes que presentan una expresión modificada de la β -glucosidasa.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende adicionalmente las etapas de:
- (a) cultivar dichos transformantes en condiciones que permiten el crecimiento de dichos transformantes; y
- (b) aislar una composición de celulasa fúngica recombinante producida por dichos transformantes.
9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha composición de celulasa fúngica recombinante se aísla mediante:
- (a) centrifugación de dicho medio de cultivo que contiene dichos transformantes para formar un sobrenadante y un sedimento; y
- (b) filtración de dicho sobrenadante para obtener una composición de celulasa fúngica recombinante.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que se añade un agente antimicrobiano a dicha composición de celulasa fúngica recombinante después de la filtración.
11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende adicionalmente la etapa de purificación de un producto de expresión de dicha composición de celulasa fúngica recombinante aislada.

ES 2 182 818 T3

12. Una composición de celulasa fúngica procedente de un hongo filamentosos, que comprende una β -glucosidasa extracelular alterada recombinante producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 únicamente en la medida en que dependan de la reivindicación 1(b).

5 13. Un método para producir glucosa a partir de materiales celulósicos o heteroglicanos que comprende el uso de una composición de celulasa fúngica recombinante que presenta una actividad β -glucosidasa aumentada, producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 únicamente en la medida en que dependan de la reivindicación 1(a).

10 14. Un método para degradar los materiales celulósicos presentes en desechos, biomasa o lodo que comprende el uso de una composición de celulasa fúngica recombinante que presenta una actividad β -glucosidasa aumentada, producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 únicamente en la medida en que dependan de la reivindicación 1(a).

15 15. Un procedimiento para degradar celulosa a glucosa, que comprende el uso de una composición de celulasa fúngica recombinante que presenta una actividad β -glucosidasa aumentada, producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 únicamente en la medida en que dependan de la reivindicación 1(a).

20 16. Un procedimiento para usar la composición de celulasa fúngica recombinante que presenta una actividad β -glucosidasa aumentada, producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 únicamente en la medida en que dependan de la reivindicación 1(a), o la β -glucosidasa purificada producida mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12 en aditivos alimentarios para potenciar el sabor y el aroma.

25 17. Una composición de detergente que comprende una cantidad limpiadora eficaz de un tensioactivo y al menos 0,0001 por ciento en peso de una composición de celulasa fúngica recombinante que presenta una actividad β -glucosidasa aumentada, producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 únicamente en la medida en que dependan de la reivindicación 1(a).

30 18. Un método para usar la composición de celulasa que presenta una actividad β -glucosidasa aumentada, producida mediante el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 únicamente en la medida en que dependan de la reivindicación 1(a), en el que dicho método comprende la adición de dicha composición de celulasa fúngica recombinante a levadura y biomasa para formar una mezcla y el cultivo de dicha mezcla a una temperatura suficiente y durante un periodo de tiempo suficiente para producir etanol.

35 19. Transformantes producidos mediante el procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7 únicamente en la medida en que dependa de la reivindicación 1(a).

40 20. Un método para usar los transformantes que presentan una actividad β -glucosidasa extracelular aumentada de la reivindicación 19 únicamente en la medida en que dependa de la reivindicación 1(a), comprendiendo dicho método la adición de dichos transformantes a levadura y biomasa para formar una mezcla y el cultivo de dicha mezcla a una temperatura suficiente y durante un periodo de tiempo suficiente para producir etanol.

45 21. El método de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 20, en el que dicha levadura es *B. clausenii*, *S. cerevisiae*, *Cellulolyticus acidothermophilum*, *C. brassicae*, *C. lustinaniae*, *S. uvarum* o *Schizosaccharomyces pombe*.

50 22. Una secuencia de nucleótidos de un gen *bgl1* cuya secuencia completa o parcial está o no marcada para el uso como sonda en la que el gen *bgl1* tiene la secuencia de nucleótidos de la Figura 1.

55 23. Un método para usar una sonda que comprende una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la reivindicación 22, para identificar un gen de la β -glucosidasa de un hongo filamentosos.

60

24. El método de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha sonda proviene de *Trichoderma reesei*.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 23 o la reivindicación 24, en el que se pueden usar una o más sondas para identificar dicho gen de la β -glucosidasa de un hongo filamentoso.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

NOTA INFORMATIVA: Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

60

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

FIG. 1

TGGCCACAGA GGGAGAGTTC GGCCTACCGC TTGGTGGAGG AAATGATGGC CCAAGGGOCTC	60
AAATCGTAAA TCTGGGTGTG GGTAGGAGTG CAAAGATGGG APTTGGGCGC AATGCTGCOG	120
AGCCCGAGTG TTTCTGCAAC GTTATCCAGG AGATTGGGC TTGCCCAGA GGGAGTTGAC	180
GGGAGAGTC CCAACTGGTT CCTTCAGTAA GGCACCCCTG GCAGACTATA TAACTTGTGG	240
ACAAGACTCT GCTTTGTGTA GTTCTTCCCA CCAGTCTTGA CCAAGACCAT TCTGTTGAGC	300
CCAATCAGAA ATG CGT TAC CGA ACA GCA GCT GCG CTG GCA CTT GCC ACT	349
Met Arg Tyr Arg Thr Ala Ala Ala Leu Ala Leu Ala Thr	
1 5 10	
GGG CCC TTT GCT ACG GCA GAC AGT CA GTATAGCTGG TOCATACTGG	395
Gly Pro Phe Ala Arg Ala Asp Ser His	
15 20	

FIG. 1 (Cont.)

GATGTGATAT	GTATCTCGA	GACACCATTC	TGACTCTTGA	ATCAAGGTAG	C	TCA	ACA													452	
																				Ser Thr	
TGG	GGG	GCC	TGG	GCT	GAG	GCA	GTT	GTA	OCT	OCT	GCA	GCG	ACT	CCA	TGG						500
Ser	Gly	Ala	Ser	Ala	Glu	Ala	Val	Val	Pro	Pro	Ala	Gly	Thr	Pro	Trp						
25					30					35					40						
GCA	ACC	GCG	TAC	GAC	AAG	GCG	AAG	GCC	GCA	TTC	GCA	AAG	CTC	AAT	CTC						548
Gly	Thr	Ala	Tyr	Asp	Lys	Ala	Lys	Ala	Ala	Leu	Ala	Lys	Leu	Asn	Leu						
				45					50						55						
CAA	GAT	AAG	GTC	GCC	ATC	GTC	ACC	GGT	GTC	GCC	TGG	AAC	GCC	GGT	OCT						596
Gln	Asp	Lys	Val	Gly	Ile	Val	Ser	Gly	Val	Gly	Trp	Asn	Gly	Gly	Pro						
			60					65						70							
TGC	GTT	GGA	AAC	ACA	TCT	CCG	GCC	TOC	AAG	ATC	AGC	TAT	CCA	TGG	CTA						644
Cys	Val	Gly	Asn	Thr	Ser	Pro	Ala	Ser	Lys	Ile	Ser	Tyr	Pro	Ser	Leu						
		75					80					85									
TGC	CTT	CAA	GAC	GGA	CCC	CTC	GGT	GTT	CGA	TAC	TGG	ACA	GGC	AGC	ACA						692
Cys	Leu	Gln	Asp	Gly	Pro	Leu	Gly	Val	Arg	Tyr	Ser	Thr	Gly	Ser	Thr						
	90					95					100										
GCC	TTT	ACG	CCG	GCC	GTT	CAA	GCG	GCC	TGG	ACG	TGG	GAT	GTC	AAT	TTC						740
Ala	Phe	Thr	Pro	Gly	Val	Gln	Ala	Ala	Ser	Thr	Trp	Asp	Val	Asn	Leu						
105					110				115						120						
ATC	CCG	GAA	CGT	GGA	CAG	TTC	ATC	GGT	GAG	GAG	GTG	AAG	GCC	TGG	GGG						788
Ile	Arg	Glu	Arg	Gly	Gln	Phe	Ile	Gly	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Ser	Gly						
				125					130						135						
ATT	CAT	GTC	ATA	CTT	GGT	OCT	GTC	GCT	GGG	CCG	CTG	GGA	AAG	ACT	CCG						836
Ile	His	Val	Ile	Leu	Gly	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Leu	Gly	Lys	Thr	Pro						
			140				145							150							
CAG	GGC	GGT	CCG	AAC	TGG	GAG	GCC	TTC	GGT	GTC	GAT	CCA	TAT	CTC	ACG						884
Gln	Gly	Gly	Arg	Asn	Trp	Glu	Gly	Phe	Gly	Val	Asp	Pro	Tyr	Leu	Thr						
		155				160						165									
GCC	ATT	GCC	ATG	GGT	CAA	ACC	ATC	AAC	GCC	ATC	CAG	TGG	GTA	GCC	GTG						932
Gly	Ile	Ala	Met	Gly	Gln	Thr	Ile	Asn	Gly	Ile	Gln	Ser	Val	Gly	Val						
	170				175						180										
CAG	GCG	ACA	GCG	AAG	CAC	TAT	ATC	CTC	AAC	GAG	CAG	GAG	CTC	AAT	CGA						980
Gln	Ala	Thr	Ala	Lys	His	Tyr	Ile	Leu	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Asn	Arg						
	185				190					195					200						
GAA	ACC	ATT	TGG	AGC	AAC	CCA	GAT	GAC	CGA	ACT	CTC	CAT	GAG	CTG	TAT						1028
Glu	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn	Pro	Asp	Asp	Arg	Thr	Leu	His	Glu	Leu	Tyr						
				205					210					215							

FIG. 1 (Cont.)

ACT TGG OCA TTT GGC GAC GGG GTT CAG GGC AAT GTC GCT TCT GTC ATG	1076
Thr Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Gln Ala Asn Val Ala Ser Val Met	
220 225 230	
TGC TGG TAC AAC AAG GTC AAT ACC ACC TGG GGC TGC GAG GAT CAG TAC	1124
Cys Ser Tyr Asn Lys Val Asn Thr Thr Trp Ala Cys Glu Asp Gln Tyr	
235 240 245	
ACG CTG CAG ACT GTG CTG AAA GAC CAG CTG GGG TTC OCA GGC TAT GTC	1172
Thr Leu Gln Thr Val Leu Lys Asp Gln Leu Gly Phe Pro Gly Tyr Val	
250 255 260	
ATG ACG GAC TGG AAC OCA CAG CAC ACG ACT GTC CAA AGC GCG AAT TCT	1220
Met Thr Asp Trp Asn Ala Gln His Thr Thr Val Gln Ser Ala Asn Ser	
265 270 275 280	
GGG CTT GAC ATG TCA ATG CCT GGC ACA GAC TTC AAC GGT AAC AAT GCG	1268
Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Thr Asp Phe Asn Gly Asn Asn Arg	
285 290 295	
CTC TGG GGT OCA GCT CTC ACC AAT GCG GTA AAT AGC AAT CAG GTC CCC	1316
Leu Trp Gly Pro Ala Leu Thr Asn Ala Val Asn Ser Asn Gln Val Pro	
300 305 310	
ACG AGC AGA GTC GAC GAT ATG GTG ACT GGT ATC CTC GGC OCA TGG TAC	1364
Thr Ser Arg Val Asp Asp Met Val Thr Arg Ile Leu Ala Ala Trp Tyr	
315 320 325	
TTG ACA GGC CAG GAC CAG GCA GGC TAT CCG TCG TTC AAC ATC AGC AGA	1412
Leu Thr Gly Gln Asp Gln Ala Gly Tyr Pro Ser Phe Asn Ile Ser Arg	
330 335 340	
AAT GTT CAA GGA AAC CAC AAG ACC AAT GTC AGG GCA ATT GCC AGG GAC	1460
Asn Val Gln Gly Asn His Lys Thr Asn Val Arg Ala Ile Ala Arg Asp	
345 350 355 360	
GGC ATC GTT CTG CTC AAG AAT GAC GGC AAC ATC CTG CCG CTC AAG AAG	1508
Gly Ile Val Leu Leu Lys Asn Asp Ala Asn Ile Leu Pro Leu Lys Lys	
365 370 375	
CCC GCT AGC ATT GGC GTC GTT GGA TCT GGC GCA ATC ATT GGT AAC CAC	1556
Pro Ala Ser Ile Ala Val Val Gly Ser Ala Ala Ile Ile Gly Asn His	
380 385 390	
GCC AGA AAC TCG CCC TCG TGC AAC GAC AAA GGC TGC GAC GAC GCG GCC	1604
Ala Arg Asn Ser Pro Ser Cys Asn Asp Lys Gly Cys Asp Asp Gly Ala	
395 400 405	
TTG GGC ATG GGT TGG GGT TCC GGC GGC GTC AAC TAT CCG TAC TTC GTC	1652
Leu Gly Met Gly Trp Gly Ser Gly Ala Val Asn Tyr Pro Tyr Phe Val	
410 415 420	

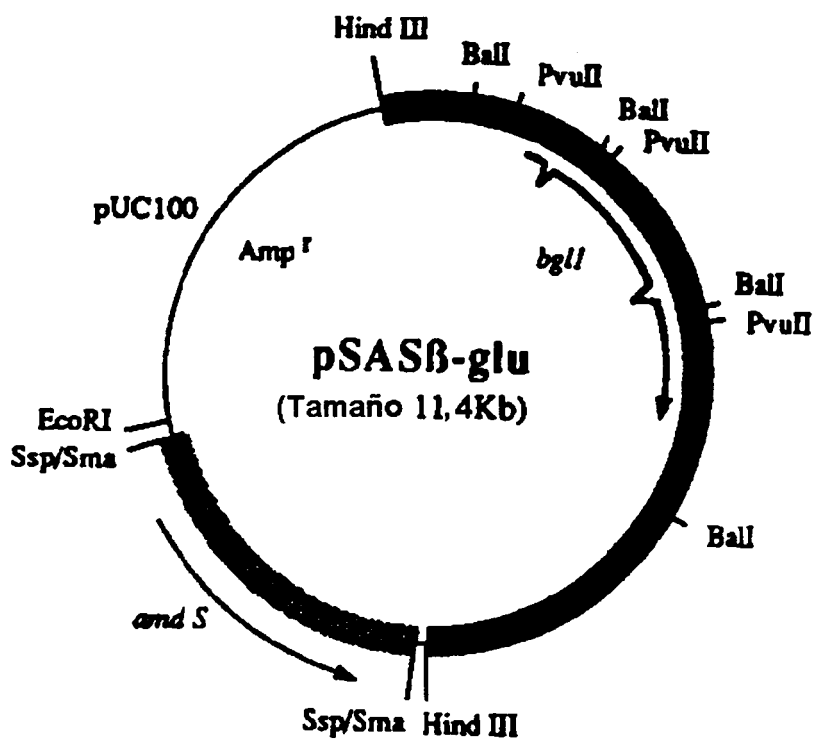
FIG. 1 (Cont.)

GCG OCC TAC GAT GGC ATC AAT ACC AGA GCG TCT TCG CAG GGC ACC CAG Ala Pro Tyr Asp Ala Ile Asn Thr Arg Ala Ser Ser Gln Gly Thr Gln 425 430 435 440	1700
GTT ACC TTG AGC AAC AOC GAC AAC ACG TOC TCA GGC GCA TCT GCA GCA Val Thr Leu Ser Asn Thr Asp Asn Thr Ser Ser Gly Ala Ser Ala Ala 445 450 455	1748
AGA GGA AAG GAC GTC GGC ATC GTC TTC ATC ACC GGC GAC TCG GGT GAA Arg Gly Lys Asp Val Ala Ile Val Phe Ile Thr Ala Asp Ser Gly Glu 460 465 470	1796
GGC TAC ATC ACC GTG GAG GGC AAC GCG GGC GAT GCG AAC AAC CTG GAT Gly Tyr Ile Thr Val Glu Gly Asn Ala Gly Asp Arg Asn Asn Leu Asp 475 480 485	1844
CCG TGG CAC AAC GGC AAT GGC CTG GTC CAG GCG GTG GGC GGT GGC AAC Pro Trp His Asn Gly Asn Ala Leu Val Gln Ala Val Ala Gly Ala Asn 490 495 500	1892
AGC AAC GTC ATT GTT GTT GTC CAC TOC GTT GGC GGC ATC ATT CTG GAG Ser Asn Val Ile Val Val Val His Ser Val Gly Ala Ile Ile Leu Glu 505 510 515 520	1940
CAG ATT CTT GCT CTT CCG CAG GTC AAG GGC GTT GTC TGG GCG GGT CTT Gln Ile Leu Ala Leu Pro Gln Val Lys Ala Val Val Trp Ala Gly Leu 525 530 535	1988
CCT TCT CAG GAG AGC GGC AAT GCG CTC GTC GAC GTG CTG TGG GGA GAT Pro Ser Gln Glu Ser Gly Asn Ala Leu Val Asp Val Leu Trp Gly Asp 540 545 550	2036
GTC AGC CCT TCT GGC AAG CTG GTG TAC ACC ATT GCG AAG AGC CCC AAT Val Ser Pro Ser Gly Lys Leu Val Tyr Thr Ile Ala Lys Ser Pro Asn 555 560 565	2084
GAC TAT AAC ACT CCG ATC GTT TOC GGC GGC AGT GAC AGC TTC AGC GAG Asp Tyr Asn Thr Arg Ile Val Ser Gly Gly Ser Asp Ser Phe Ser Glu 570 575 580	2132
GGA CTG TTC ATC GAC TAT AAG CAC TTC GAC GAC GGC AAT ATC ACG CCG Gly Leu Phe Ile Asp Tyr Lys His Phe Asp Asp Ala Asn Ile Thr Pro 585 590 595 600	2180
CCG TAC GAG TTC GGC TAT GGA CTG T GGAAGTTTGC TAACTGAAC Arg Tyr Glu Phe Gly Tyr Gly Leu 605	2225
AATCTATATAG ACAGGTTGAC TGAAGGATGA CTGTGGAATG ATAG CT TAC ACC AAG Ser Tyr Thr Lys 610	2280

FIG. 1 (Cont.)

TTC AAC TAC TCA CGC CTC TCC GTC TTG TGG ACC GGC AAG TCT GGT OCT Phe Asn Tyr Ser Arg Leu Ser Val Leu Ser Thr Ala Lys Ser Gly Pro 615 620 625	2328
GCG ACT GGG GGC GTT GTG CCG GGA GGC CCG AGT GAT CTG TTC CAG AAT Ala Thr Gly Ala Val Val Pro Gly Gly Pro Ser Asp Leu Phe Gln Asn 630 635 640	2376
GTC GCG ACA GTC ACC GTT GAC ATC GCA AAC TCT GGC CAA GTG ACT GGT Val Ala Thr Val Thr Val Asp Ile Ala Asn Ser Gly Gln Val Thr Gly 645 650 655 660	2424
GCC GAG GTA GGC CAG CTG TAC ATC ACC TAC CCA TCT TCA GCA CCG AGG Ala Glu Val Ala Gln Leu Tyr Ile Thr Tyr Pro Ser Ser Ala Pro Arg 665 670 675	2472
ACC OCT CCG AAG CAG CTG CGA GGC TTT GCC AAG CTG AAC CTC ACG OCT Thr Pro Pro Lys Gln Leu Arg Gly Phe Ala Lys Leu Asn Leu Thr Pro 680 685 690	2520
GGT CAG AGC GGA ACA GCA ACG TTC AAC ATC CGA CGA CGA GAT CTC AGC Gly Gln Ser Gly Thr Ala Thr Phe Asn Ile Arg Arg Arg Asp Leu Ser 695 700 705	2568
TAC TGG GAC ACG GCT TGG CAG AAA TGG GTG GTG CCG TGG GCG TCG TTT Tyr Trp Asp Thr Ala Ser Gln Lys Trp Val Val Pro Ser Gly Ser Phe 710 715 720	2616
GGC ATC AGC GTG GGA GCG AGC AGC CCG GAT ATC AGG CTG ACG AGC ACT Gly Ile Ser Val Gly Ala Ser Ser Arg Asp Ile Arg Leu Thr Ser Thr 725 730 735 740	2664
CTG TGG GTA GCG TAGCGGAGG ACGGTGAAGG CCGTTGAOCT GTGACTGTGA Leu Ser Val Ala 745	2716
GTGAGGACCG AAGGTGGGAT GGCGTGAATA CTGCAGGAAT ACAATCTTCA GGATAGGCAT	2776
CAGAGCAGTA ACATGAATGA TGAAGACCGC CGAAGCAGAA GTGAATGAG CAGGTAGTGA	2836
TGATGAAATG TGAGGGAAGA GAGATGTTCA ATCAOCTTGT TOGAGGGAG CTGCAAAITG	2896
GGOCTCAOGT CATCTOGCAG AGAGAAGGAA CTCTTGCAGC AGGAGTTCIG CTCACTGAGA	2956
AGAAGGCOOG GGTTAGGTC GCGOCTCTTC CGGACATOC TOOGCTOOG CACTGTGCTG	3016
TCAAACCTGGC ACCAACA	3033

FIG. 2



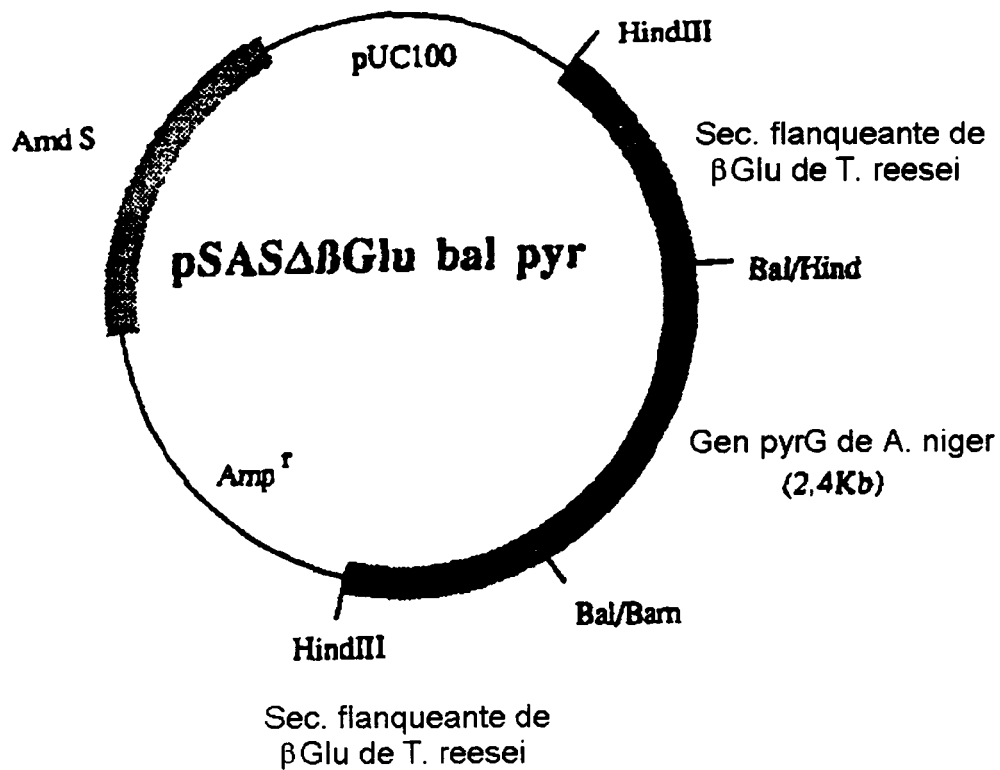


FIG. 3A

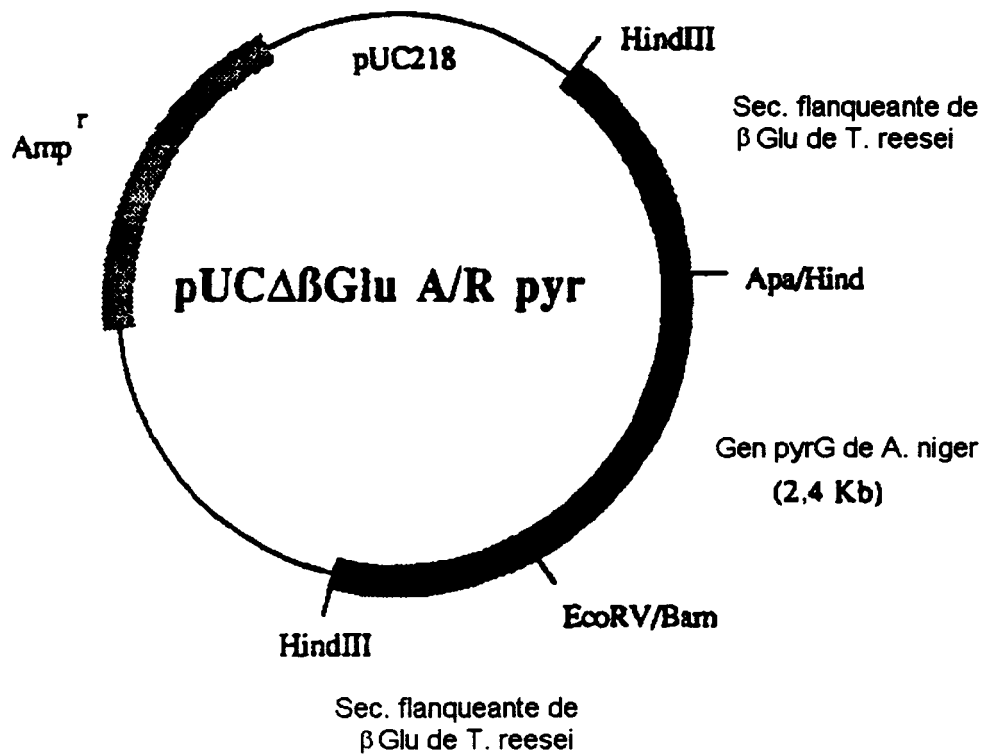


FIG. 3B

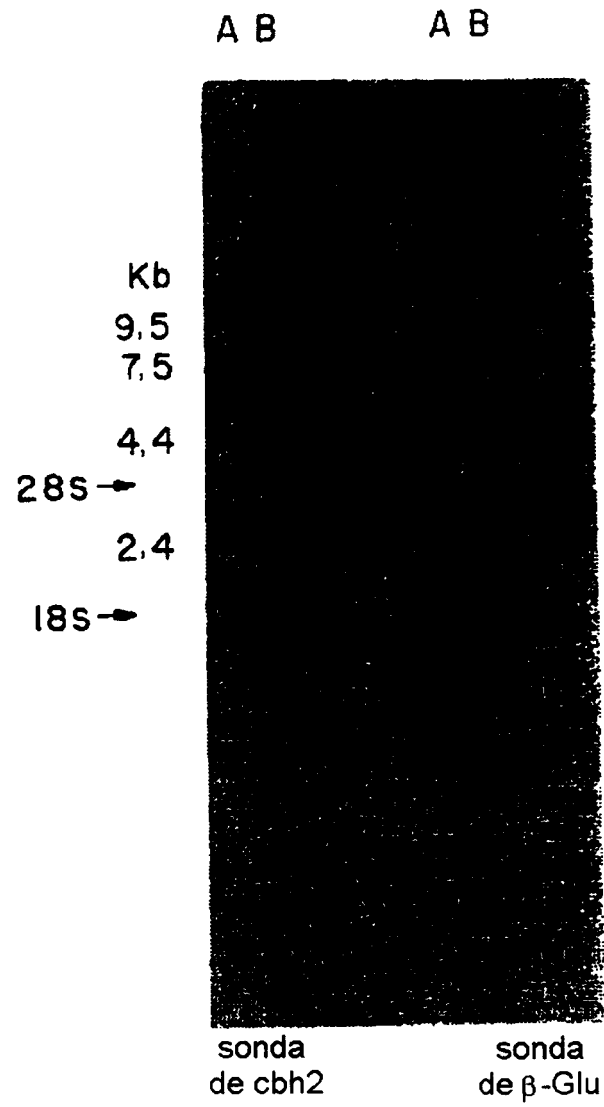


FIG. 4

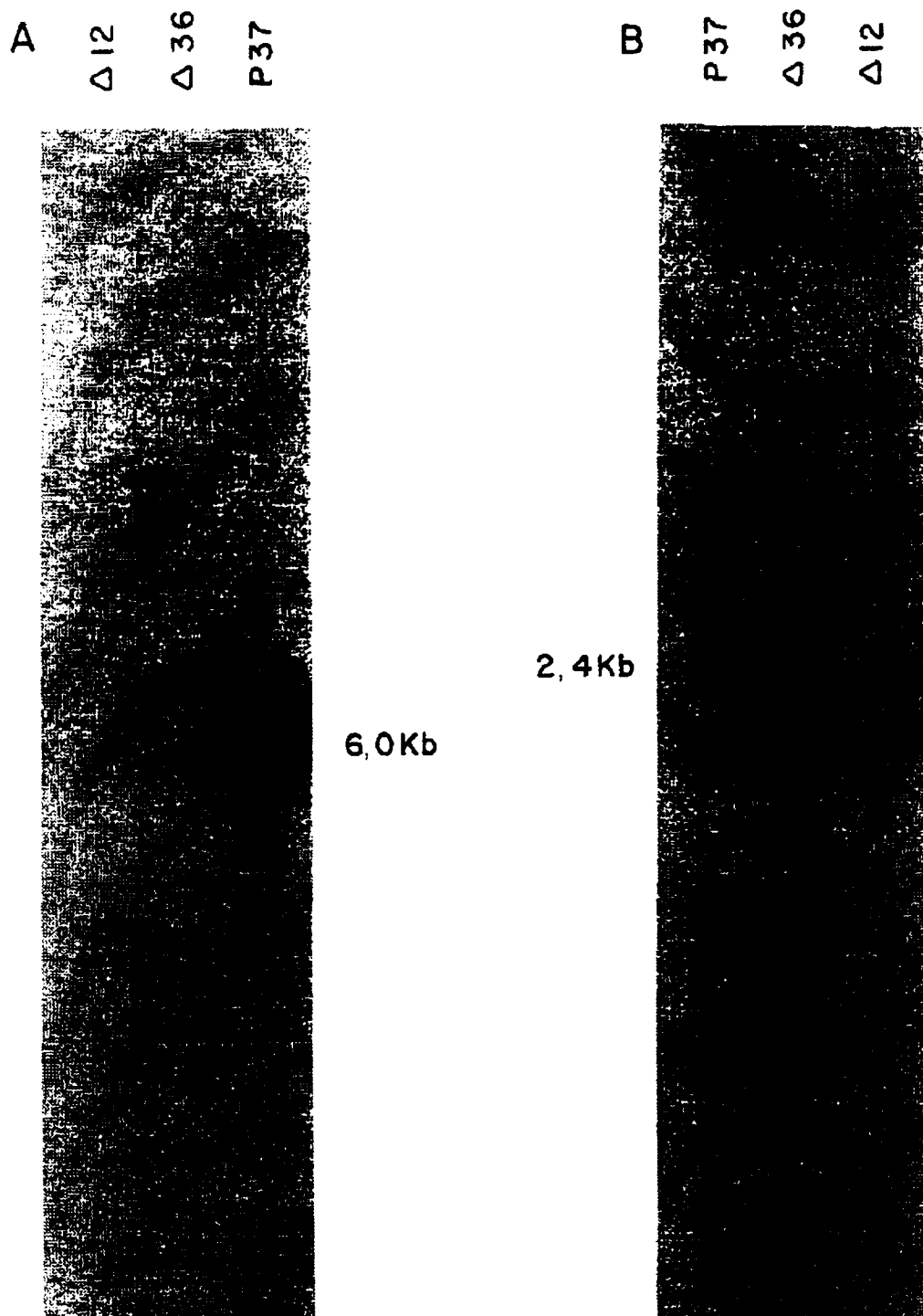


FIG. 5A

FIG. 5B

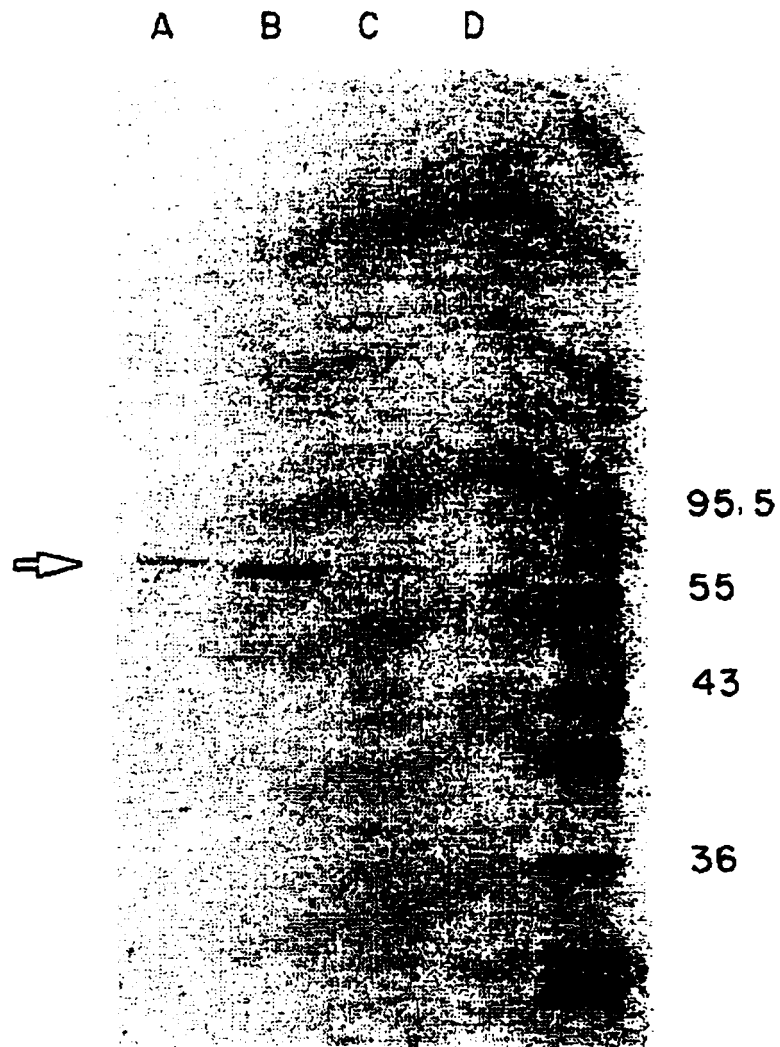


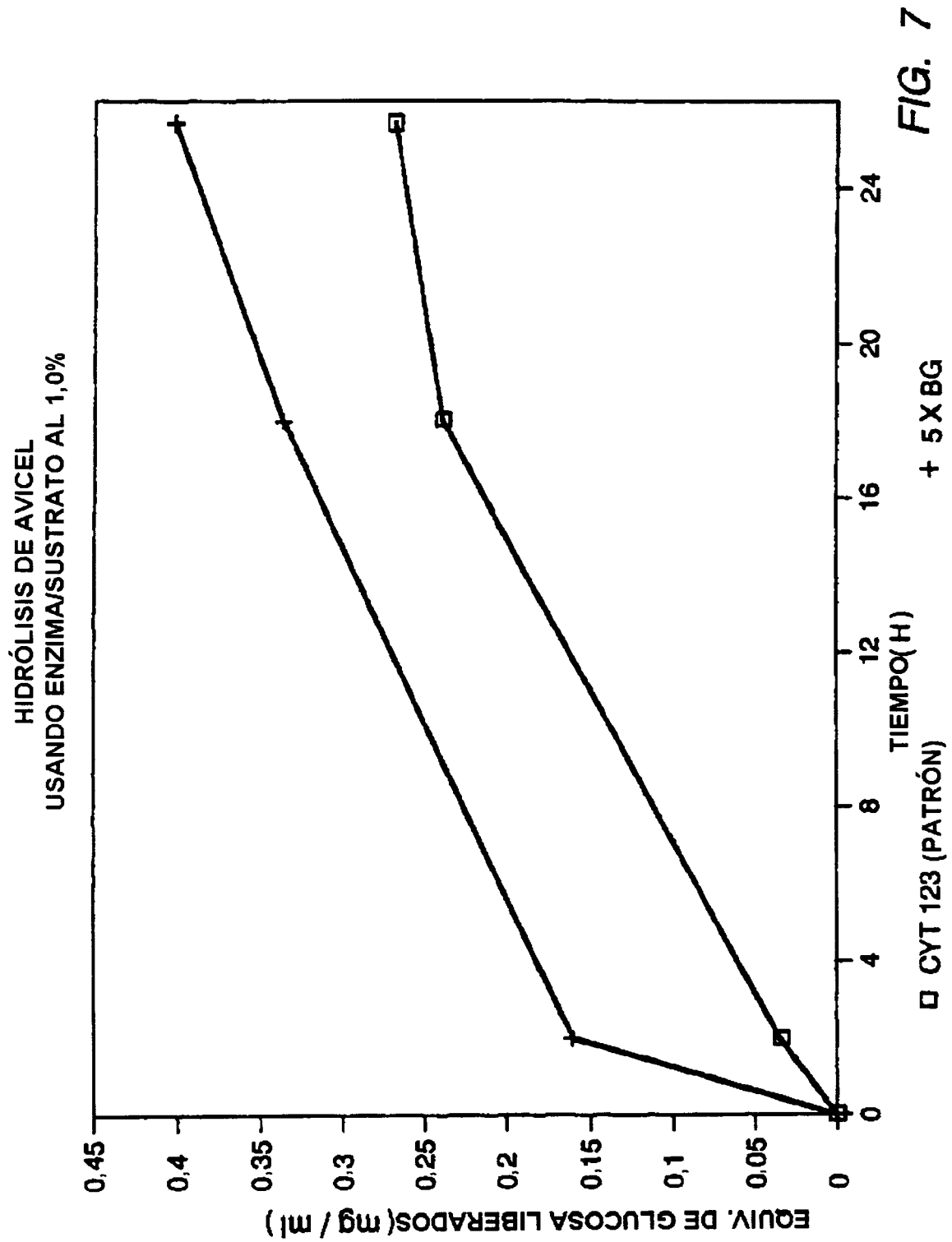
FIG. 5C

ES 2 182 818 T3

1 2 3 4 5 7 8 9



FIG. 6



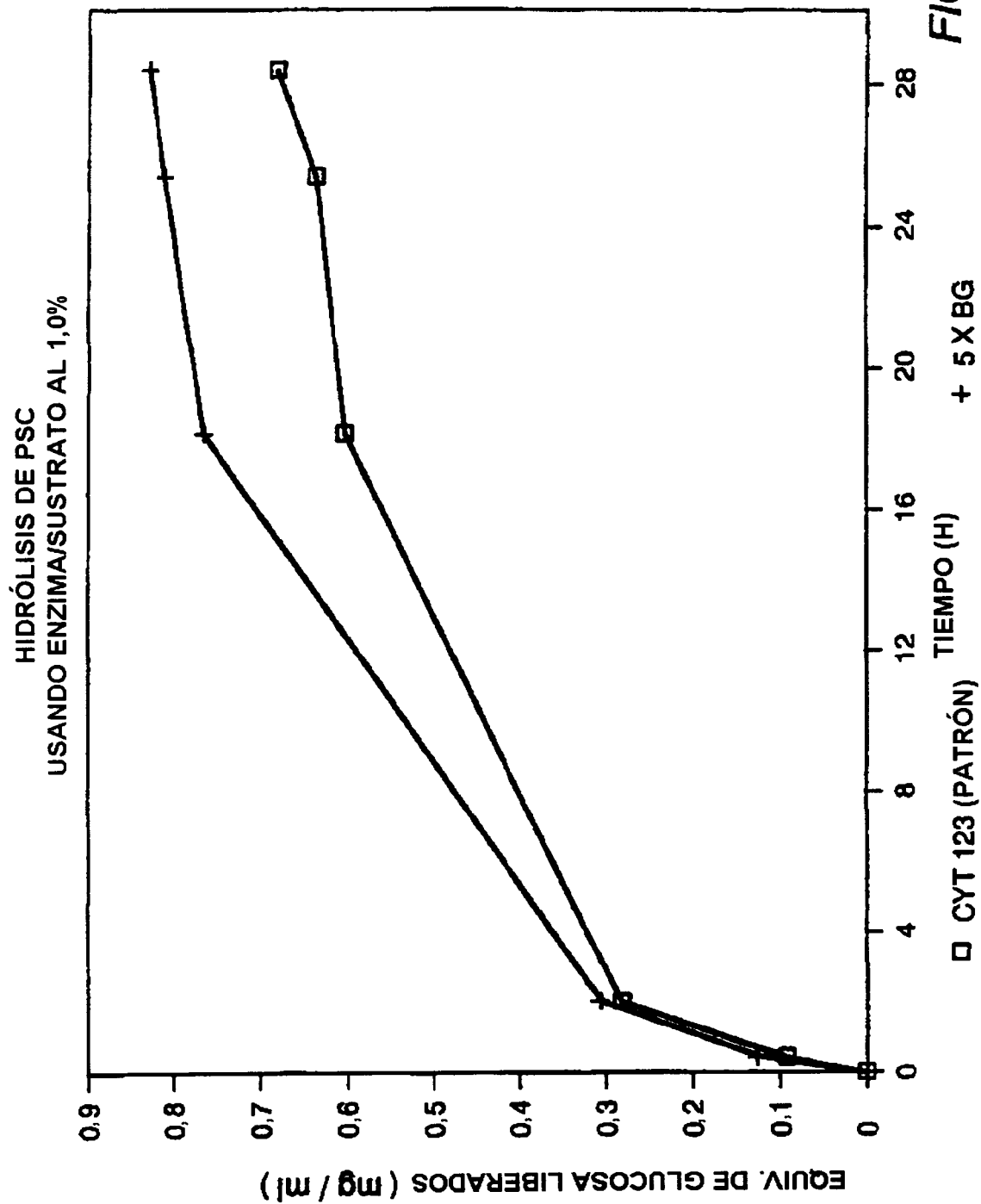
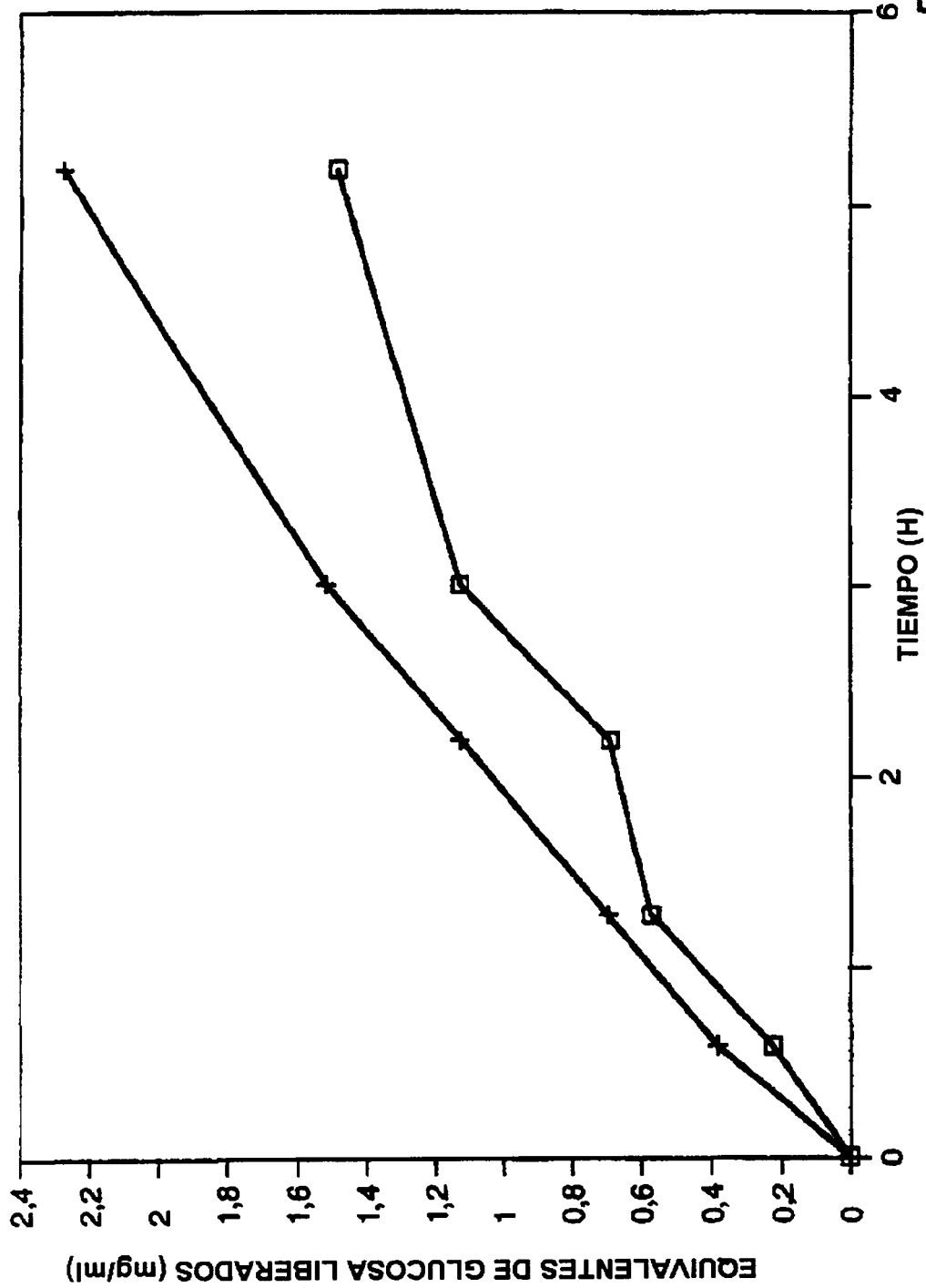


FIG. 8

VELOCIDAD DE HIDRÓLISIS - PAÑAL CELULÓSICO
USANDO CYT 123 FRENTE A β G AUMENTADA



□ CYT 123-87111 (PATRÓN) * β G AUMENTADA OBTENIDA POR INGENIERÍA GENÉTICA **FIG. 9**

ES 2 182 818 T3

EcoRI
HindIII

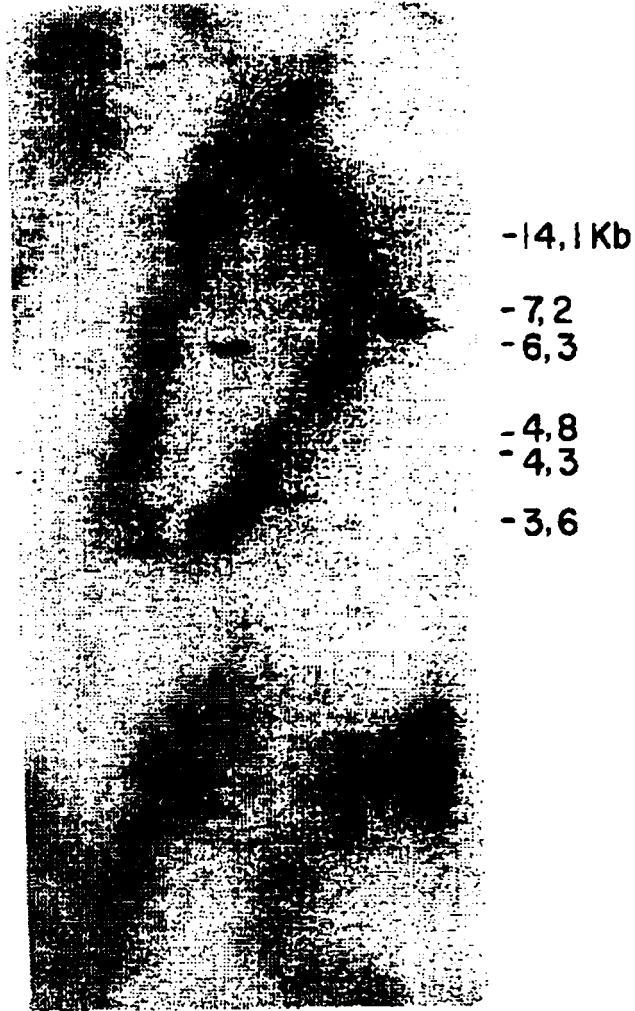
EcoRI
HindIII



A. nidulans N. crassa

FIG. 10A

BamHI
EcoRI
HindIII
PstI



Humicola grisea

FIG. 10B