



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 299 486**

51 Int. Cl.:
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
A61K 38/47 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A23K 1/165 (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01936109 .6**
86 Fecha de presentación : **20.03.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1272643**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.01.2003**

54 Título: ***β -glucanasas de *Talaromices emersonii****

30 Prioridad: **20.03.2000 EP 00302263**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2008

73 Titular/es: **BASF SE**
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:
Van den Hombergh, Johannes Petrus Theodorus;
Van der Laan, Jan-Metske;
Daran, Jean-Marc Georges;
Herweijer, Margareta Adriana y
Teufel, Daniel Paul

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 299 486 T3

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

DESCRIPCIÓN

β -glucanasas de *Talaromices emersonii*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con (β -)glucanasas novedosas (y también con celulasas) del hongo *Talaromices*, en particular *Talaromices emersonii*, y su uso para degradar glucan en celulosa.

10 **Antecedentes de la invención**

La composición de una pared de célula vegetal es compleja y variable. Los polisacáridos se encuentran principalmente en la forma de cadenas largas de celulosa (el componente estructural principal de la pared celular vegetal), hemicelulosa (que comprende varias cadenas de β -xilano, tales como xiloglucanos) y pectina.

El beta-glucano (o, más propiamente, (1 \rightarrow 3)(1 \rightarrow 4) β -D-glucan), PM 10 a 14 kDa, es un componente de hemicelulosa vegetal (PM de aproximadamente 700 kDa) y consiste de una estructura de residuos de glucopiranososa β -1,4 y 1,3 ligados. Otro componente es el xilano que consiste de residuos de xilosa β -1,4 ligados, opcionalmente sustituidos con cadenas laterales tales como arabinosa y/o residuos de ácido glucurónico.

Existen diferencias básicas entre monocotiledones (por ejemplo, cereales y pastos) y dicotiledones (por ejemplo, trébol, colza y soja) y entre la semilla y partes vegetativas de la planta. Los monocotiledones se caracterizan por la presencia de un complejo de arabinoxilano como la estructura hemicelulosa principal, y la estructura principal de hemicelulosa en dicotiledones es un complejo de xiloglucano. Mayores concentraciones de pectina se encuentran en los dicotiledones que en los monocotiledones. Las semillas son generalmente altas en sustancias pécticas pero relativamente bajas en material celulósico.

Las enzimas que degradan la celulosa se utilizan para procesar material vegetal en alimentos así como también aplicaciones de alimento o como aditivos de comida o alimento debido a su capacidad de actuar sobre los sustituyentes principales de la pared celular de la planta.

La mayoría de las enzimas que degradan la celulosa disponibles para la industria parecen ser las glucanasas con un peso molecular relativamente bajo y una estabilidad moderada a temperaturas altas. MOLONEY A. P. *et al.* (BIO-CHEMICAL JOURNAL, Vol. 225, No. 2. 1985, páginas 365-374) describe cuatro endo-Glucanasas de *T. emersonii* que muestran una actividad óptima a un pH de 5,5 a 5,8 y a una temperatura de 75°C a 70°C. Sin embargo, para ciertas aplicaciones es deseable utilizar una glucanasa con una termoestabilidad relativamente alta. Si la glucanasa se va a utilizar como un aditivo de alimento animal se prefiere entonces la alta termoestabilidad en razón de las condiciones de alta temperatura aplicadas durante el apelmazado del alimento animal.

40

Resumen de la invención

Se suministran ahora β -glucanasas novedosas (o celulasas) que son capaces de dividir β -D-glucano (o celulosa) tal como está presente en el material vegetal.

45

Se suministra un polipéptido, el cual es una β -glucanasa obtenible de un hongo del género *Talaromices*, tal como el hongo *Talaromices emersonii*, que tiene la actividad EC 3.2.1.4 (actividad endoglucanasa) que comprende:

- 50 (i) la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No.2; o
- (ii) una variante de (i) que es capaz de dividir el β -D-glucano que tiene por lo menos 70% de identidad sobre la longitud completa de la SEQ ID No. 2 o por lo menos 80% sobre una región de por lo menos 150 aminoácidos de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 2; o
- 55 (iii) un fragmento de (i) o (ii) que es capaz de dividir β -D-glucano.

En su aspecto más amplio, la invención se relaciona con β -glucanasas (o celulasas) de *Talaromices*, tales como *Talaromices emersonii* (un hongo). Estas β -glucanasas pueden dividir el β -D-glucano o celulosa, por ejemplo ellas son β -1,4-endoglucanasas, o tienen la actividad EC 3.2.1.4.

60

Las glucanasas pueden tener:

- 65 a. un pH óptimo por debajo de 7,0 o 5,4, tal como 5,0, por ejemplo, 4,4 a 5,2 o desde 3,0 a 6,0 o 7,0; o
- b. una temperatura óptima de por lo menos 72°C, 75°C o aún 81°C, tal como desde 78°C a 85°C o desde 83°C a 87°C.

ES 2 299 486 T3

Más específicamente, la presente invención suministra un polipéptido de β -glucanasa (aislado) que comprende:

- (i) la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No: 2; o
- (ii) una variante de (i) que es capaz de dividir β -D-glucano; o
- (iii) un fragmento de (i) o (ii) que es capaz de dividir β -D-glucano.

De acuerdo con otro aspecto de la invención se suministra un polinucleótido que comprende:

- (a) la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID No. 1, o una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente;
- (b) una secuencia que es complementaria a, o que hibrida bajo condiciones de exigencia alta, una secuencia como se define en (a) sobre la longitud completa;
- (c) un fragmento de cualquier secuencia en (a) o (b);
- (d) una secuencia que tiene por lo menos 75%, preferiblemente 80%, de identidad con cualquier secuencia como se define en (a); o
- (e) una secuencia que se degenera como resultado del código genético de cualquiera de las secuencias como se define en (a).

La invención también suministra:

- un vector (por ejemplo, expresión) que comprende un polinucleótido de la invención y el cual puede ser capaz de expresar un polipéptido de la invención;
- una línea celular o cepa que comprende un vector de la invención;
- un método para producir un polipéptido de la invención cuyo método comprende mantener una línea celular o cepa de la invención bajo condiciones adecuadas para obtener la expresión del polipéptido y, si es necesario, aislar el polipéptido;
- un método para degradar β -D-glucano, el método comprende poner en contacto un material que comprende β -D-glucano con un polipéptido de la invención;
- un método para la identificación de un compuesto que modula la actividad de β -glucanasa, cuyo método comprende poner en contacto un polipéptido de la invención con un compuesto de prueba en la presencia de β -D-glucano y monitorear o detectar cualquier modulación de la actividad;
- un método para tratar un sujeto que tiene hiperlipidemia cuyo método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva del polipéptido de la invención; y
- el uso de un polipéptido en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de hiperlipidemia.

Breve descripción de las secuencias

SEQ ID No. 1 es una secuencia de ADN de una primera β -glucanasa (CEA) de la invención de *Talaromices emersonii*,

SEQ ID No. 2 es la secuencia de aminoácido de la primera β -glucanasa, CEA;

SEQ ID Nos. 7 y 8 son cebadores de PCR que hibridizan a la SEQ ID No. 1 (y se utilizaron para reclinar los insertos de cADN durante el análisis genético de los transformantes positivos).

Descripción detallada de la invención

A. Polinucleótidos

La presente invención suministra un polinucleótido (por ejemplo, aislado y/o purificado) que codifica polipéptidos de la invención. La presente invención suministra así un polinucleótido que codifica una β -glucanasa cuya secuencia de aminoácido se establece en la SEQ ID No. 2. La presente invención suministra además un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una homología de secuencia de aminoácido sustancial con la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID No. 2. También se incluye un polinucleótido seleccionado de:

ES 2 299 486 T3

- (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID No. 1, o el complemento de ésta;
- (b) un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótido capaz de hibridar (por ejemplo, selectivamente) a una secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID No. 1 o un fragmento de ésta;
- (c) un polinucleótido que comprende una secuencia capaz de hibridar (por ejemplo, selectivamente) al complemento de la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID No. 1, o un fragmento de ésta; y/o
- (d) un polinucleótido que comprende una secuencia de polinucleótido que se degenera como resultado del código genético a un polinucleótido definido en (a), (b) o (c).

Un polinucleótido de la invención también incluye un polinucleótido que:

- (a) codifica un polipéptido que tiene una actividad de β -glucanasa, cuyo polinucleótido es:
- (1) la secuencia codificante de la SEQ ID No. 1;
 - (2) una secuencia que hibrida selectivamente el complemento de la secuencia definida en (1); o
 - (3) una secuencia que se degenera como resultado del código genético con respecto a una secuencia definida en (1) o (2); o
- (b) es una secuencia complementaria al polinucleótido definido en (a).

Secuencias Hibridantes

El término “capaz de hibridar” significa que el polinucleótido objetivo de la invención puede hibridar al ácido nucleico utilizado como una sonda (por ejemplo la secuencia de nucleótido establecida en la SEQ ID No. 1, o un fragmento de ésta o el complemento de ésta) a un nivel significativamente por encima del antecedente. La invención también incluye secuencias de nucleótido que codifican para β -glucanasa o variantes de éstas así como también las secuencias de nucleótido que son complementaria a éstas. La secuencia de nucleótido puede ser ARN o ADN y así incluir ADN genómico, ADN sintético o cADN. Preferiblemente la secuencia de nucleótido es una secuencia de ADN y más preferiblemente, una secuencia de cADN. Típicamente un polinucleótido de la invención comprende una secuencia contigua de nucleótidos que es capaz de hibridar bajo condiciones selectivas a la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de la SEQ ID No. 1, según sea apropiado. Tales nucleótidos se pueden sintetizar de acuerdo con los métodos bien conocidos en la técnica.

Un polinucleótido de la invención puede hibridar la secuencia codificante o el complemento de la secuencia codificante de la SEQ ID No. 1 (según sea apropiado) a un nivel significativamente por encima del antecedente. La hibridación del antecedente puede ocurrir, por ejemplo, en razón a otros cADN presentes en una colección cADN. El nivel de señal (por ejemplo, generado por la interacción entre un polinucleótido de la invención y la secuencia codificante o complemento de la secuencia codificante de la SEQ ID No. 1) es típicamente por lo menos 10 veces, preferiblemente por lo menos 100 veces, tan intensa como las interacciones entre los otros polinucleótidos y la secuencia codificante de la SEQ ID No. 1. La intensidad de interacción se puede medir, por ejemplo, al radiomarcarse una sonda, por ejemplo, con ^{32}P . La hibridación selectiva se puede lograr típicamente utilizando condiciones de exigencia bajas (0,3M de cloruro de sodio y 0,03M de citrato de sodio a aproximadamente 40°C), exigencia media (por ejemplo, 0,3M de cloruro de sodio y 0,03M de citrato de sodio a aproximadamente 50°C) o exigencia alta (por ejemplo, 0,3M de cloruro de sodio y 0,03M de citrato de sodio a aproximadamente 60°C). La hibridación se puede llevar a cabo bajo cualquier condición adecuada conocida en la técnica¹ y, como un guía, la exigencia baja puede ser 2 x SSC a 55°C, la exigencia media puede ser 0,5 a 1.0 x SSC a 60°C y la exigencia alta puede ser 0,1 o 0,2 x SSC a 60°C (por ejemplo, a 68°C), todos a 0,5% de SDS.

Modificaciones

Los polinucleótidos de la invención pueden comprender ADN o ARN. Ellos pueden ser de cadena simple o doble. Ellos también pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de ellos uno o más nucleótidos sintéticos o modificados. Un número de diferentes tipos de modificaciones a los polinucleótidos se conocen en la técnica. Estos incluyen estructuras de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, se debe entender que los polinucleótidos descritos aquí se pueden modificar mediante cualquier método disponible en la técnica.

Se debe entender que las personas expertas pueden, utilizando técnicas de rutina, hacer sustituciones de nucleótido que no afecten la secuencia de polipéptido codificada por los polinucleótidos de la invención para reflejar el uso del codón de cualquier organismo huésped particular, por ejemplo en el cual los polipéptidos de la invención van a ser expresados.

ES 2 299 486 T3

La secuencia codificante de la SEQ ID No. 1 se puede modificar por las sustituciones de nucleótido, por ejemplo, desde o hasta 1, 2 o 3 a 10, 25, 50 o 100 sustituciones. El polinucleótido puede ser alternativa o adicionalmente modificado por una o más inserciones y/o supresiones y/o por la extensión de uno o ambos extremos. El polinucleótido modificado generalmente codifica un polipéptido el cual tiene una actividad de β -glucanasa. Se pueden hacer las sustituciones degeneradas y/o se pueden hacer sustituciones que darían como resultado una sustitución de aminoácido conservadora cuando se traduce la secuencia modificada, por ejemplo como se discute con referencia los polipéptidos posteriormente.

Homólogos

Una secuencia de nucleótido que es capaz de hibridar selectivamente a (por ejemplo, el complemento de) la secuencia codificante de ADN de la SEQ ID No. 1 puede tener por lo menos 50% o 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de la identidad de secuencia (u homología) con la secuencia codificante de la SEQ ID No. 1. Esta puede estar sobre una región de por lo menos 20, preferiblemente por lo menos 30, por ejemplo por lo menos 40, por lo menos 60, más preferiblemente por lo menos 100 nucleótidos contiguos u óptimamente sobre una longitud de la SEQ ID No. 1. Para la SEQ ID No. 1, la identidad de secuencia es preferiblemente por lo menos 75% u 80%.

Cualquier combinación de los grados anteriormente mencionados de homología y el tamaño minimizado se pueden utilizar para definir los polinucleótidos de la invención, con las combinaciones más exigentes (es decir, homología más alta sobre longitudes más largas) que son las preferidas. Así por ejemplo un polinucleótido que es por lo menos 80% o 90% homólogo sobre 25, preferiblemente sobre 30 nucleótidos forman un aspecto de la invención, y hacen un polinucleótido que es por lo menos 90% homólogo sobre 40 nucleótidos.

Los homólogos de las secuencias de polinucleótido (o proteína) típicamente tienen por lo menos 70% de homología, preferiblemente por lo menos 80%, 90%, 95%, 97% o 99% de homología, por ejemplo sobre una región de por lo menos 15, 20, 30, 100 nucleótidos más contiguos (o aminoácidos). La homología se puede calcular sobre la base de la identidad del aminoácido (algunas veces denominado como "homología dura").

Por ejemplo el Paquete UWGCG suministra el programa BESTFIT que se puede utilizar para calcular la homología (por ejemplo utilizada sobre sus configuraciones⁵ por defecto). Los algoritmos PILEUP y BLAST se pueden utilizar para calcular la homología o alinear secuencias (tales como identificar las secuencias equivalentes o correspondientes de identificación, por ejemplo sobre sus configuraciones^{6,7} por defecto).

El *software* para desarrollar los análisis BLAST está públicamente disponible a través de la Información del Centro Nacional de Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo involucra identificar primero un par de secuencias de alta calificación (HSP) al identificar palabras cortas de longitud W en la secuencia de pregunta que coincide o satisface alguna calificación de umbral valorado positivamente T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se denomina como el umbral de calificación de la palabra vecina^{6,7}. Estos golpes de la palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que los contienen. Los golpes de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en tanto que la calificación del alineamiento acumulado se puede incrementar. Las extensiones para los golpes de la palabra en cada dirección se detienen cuando: la calificación del alineamiento acumulado cae por la cantidad X. De su máximo valor logrado; la calificación acumulada va a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuo con calificación negativa; o se alcanza el final de su secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLAST utiliza por defecto la longitud de la palabra (W) de 11, los alineamientos de la matriz⁸ de la calificación BLOSUM62 (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST desarrolla un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias⁹. Una medida de la similitud suministrada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que suministra una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótido o aminoácido ocurriría por casualidad. Por ejemplo, se considera que una secuencia es similar a otra secuencia si la probabilidad de la suma más pequeña en comparación de la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferiblemente menos de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

Cebadores y Sondas

Los policotiledones de la invención incluyen y se pueden utilizar como cebadores, por ejemplo, un cebador PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, o los polinucleótidos se pueden clonar en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos serán por lo menos hasta de 20, por ejemplo por lo menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud. Ellos serán típicamente de hasta 40, 50, 60, 70, 100, 150, 200 o 300 nucleótidos de longitud, o aún hasta unos pocos nucleótidos (tal como 5 o 10 nucleótidos) cortos de la secuencia codificante de la SEQ ID No. 1.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, involucrando la elaboración a manera de etapa de la secuencia de ácido nucleico deseada un nucleótido a la vez. Las técnicas para lograr esto utilizando técnicas

automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica. Ejemplos de cebadores de la invención se establecen en la SEQ ID No. 7 y 8.

5 Los polinucleótidos más largos generalmente serán producidos utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación como técnicas de clonación PCR (reacción de cadena de polimerasa). Esto involucrará elaborar un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15-30 nucleótidos) a una región de β -glucanasa que se desea clonar, llevando los cebadores a contacto con el mRNA o cADN obtenido de una célula objetivo (por ejemplo, levadura, bacteria, planta, procariótico u hongo), preferiblemente de una cepa de *Talaromices*, que desarrolla una reacción de cadena de polimerasa bajo condiciones que realizan la amplificación de la región deseada, aislando el fragmento amplificado (por ejemplo, al purificar la mezcla de reacción sobre un gel de azarosa) y recuperando el ADN amplificado. Los cebadores se pueden diseñar para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuadas de tal forma que el ADN amplificado se puede clonar en un vector de clonación.

15 Tales técnicas se pueden utilizar para obtener todo o parte de la secuencia de β -glucanasa descrita aquí. Los clones genómicos que corresponden al cADN de la SEQ ID No. 1 o el gen de β -glucanasa que contiene, por ejemplo, los intrones y las regiones promotoras también corresponden a la invención y se pueden obtener también de manera análoga (por ejemplo, medios recombinantes, PCR, técnicas de clonación), iniciando con el ADN genómico proveniente de un hongo, levadura, bacteria, planta o célula procariótica.

20 Los polinucleótidos o cebadores pueden llevar una marca revelante, por ejemplo, una marca radioactiva o no radioactiva. Las marcas adecuadas incluyen radioisótopos tales como ^{32}P o ^{35}S , marcas de enzimas, u otras marcas de proteína tales como la biotina. Tales marcas se pueden agregar a polinucleótidos o cebadores de la invención y se pueden detectar utilizando técnicas conocida *per se*.

25 Los polinucleótidos, marcados y no marcados se pueden utilizar en pruebas basadas en ácido nucleico para detectar o secuenciar β -glucanasa o una variante de ésta en una muestra (por ejemplo, de hongo). Tal prueba para detectar comprende generalmente llevar una muestra (por ejemplo, hongo) que (se sospecha) que contiene ADN en contacto con una sonda o cebador de la invención bajo condiciones hibridizantes y detectar cualquier dúplex formado entre la sonda y el ácido nucleico en la muestra. Tal detección se puede lograr al utilizar técnicas tales como PCR o al inmovilizar la sonda sobre un soporte sólido, remover el ácido nucleico en la muestra que no se hibrida a la sonda, y luego detectar el ácido nucleico que se hibridó en la sonda. Alternativamente, el ácido nucleico de muestra se puede inmovilizar sobre un soporte sólido, y la cantidad de la sonda unida a tal soporte se puede detectar.

35 Las sondas de la invención pueden ser convenientemente empacadas en la forma de un kit de prueba en un recipiente adecuado. En tales kits la sonda se puede unir a un soporte sólido donde el formato de ensayo para el cual se diseña el kit requiere tal unión. El kit también puede contener reactivos adecuados para tratar la muestra a ser probada, hibridando la sonda al ácido nucleico en la muestra, los reactivos de control, instrucciones, y similares.

40 Preferiblemente, el polinucleótido de la invención es obtenible del mismo organismo que el polipéptido, tal como un hongo, en particular un hongo del género *Talaromices*.

Los polinucleótidos de la invención también incluyen variantes de la secuencia de la SEQ ID No. 1 que tiene actividad de β -glucanasa. Las variantes se pueden formar mediante adiciones, sustituciones y/o supresiones y pueden tener la capacidad de dividir un polímero de β -D-glucano.

45 *Producción de polinucleótidos*

Los polinucleótidos que no tienen 100% de identidad con la SEQ ID No. 1 pero que caen dentro del alcance de la invención se pueden obtener de numerosas maneras. Así las variantes de la secuencia de β -glucanasa descritas aquí se pueden obtener por ejemplo al sondear las colecciones de ADN genómico hechas de un rango de organismos, por ejemplo aquellos discutidos como fuentes de los polipéptidos de la invención. Además, otros hongos, plantas u homólogos procarióticos de la β -glucanasa se pueden obtener y tales homólogos y fragmentos de éstos en general serán capaces de hibridar a la SEQ ID No. 1. Tales secuencias se pueden obtener al sondear colecciones de cADN o colección de ADN genómico de otras especies, y sondear tales colecciones con sondas que comprenden todo o parte de la SEQ ID No. 1 bajo condiciones de medio a exigencia cercana (como se describió anteriormente). Las sondas de ácido nucleico que comprenden todo o parte de la SEQ ID No. 1 se pueden utilizar para sondear colecciones de cADN provenientes de otras especies, como aquellas descritas como fuentes de los polipéptidos de la invención.

60 Los homólogos de las especies también se pueden obtener utilizando PCR degenerado que utilizará cebadores diseñados para apuntar a secuencias dentro de las variantes y los homólogos que codifican las secuencias de aminoácido conservadas. Los cebadores pueden contener una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones estrictas inferiores a aquellas utilizadas para las secuencias de clonación con cebadores de secuencia única contra secuencias conocidas.

65 Alternativamente, tales polinucleótidos se pueden obtener mediante mutagénesis dirigida de sitio de las secuencias de β -glucanasa o las variantes de ésta. Esto puede ser útil donde los ejemplos de los cambios de codón silencioso se requieren para las secuencias para optimizar las preferencias de codón para una célula huésped particular en la cual las secuencias de polinucleótido están siendo expresadas. Otros cambios de las secuencias se pueden desear con el fin

ES 2 299 486 T3

de introducir sitios de reconocimiento de enzima de restricción, o alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

5 La invención incluye polinucleótidos de cadena doble que comprenden un polinucleótido de la invención y su complemento.

La presente invención también suministra polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención descritos adelante. En razón a que tales polinucleótidos serán útiles como secuencias para la producción recombinante del polipéptido de la invención, no es necesario para ellos ser capaz de hibridar la secuencia de la SEQ ID No. 1, aunque esto será generalmente deseable. De otra forma, tales polinucleótidos se pueden marcar, utilizar, y hacer como se describió anteriormente si se desea.

B. Polipéptidos

15 La presente invención se relaciona con β -glucanasas (por ejemplo, (sustancialmente) purificadas y/o aisladas) (o celulasas) y variantes de éstas. Los polipéptidos de la invención pueden consistir esencialmente de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 2 o de una variante de esa secuencia. Los polipéptidos también se pueden codificar mediante un polinucleótido de la invención como se describió anteriormente.

20 Un polipéptido de la invención puede estar en forma aislada o sustancialmente purificada. Se entenderá que el polipéptido se puede mezclar con portadores o diluyentes que no interferirán con el propósito pretendido y/o la función del polipéptido y aún se considerará como sustancialmente aislado. Éste generalmente comprenderá el polipéptido en un preparación en la cual más del 20%, por ejemplo, más del 30%, 40%, 50%, 80%, 90%, 95%, o 99%, en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención. Los métodos de rutina se pueden emplear para purificar y/o sintetizar las proteínas de acuerdo con la invención¹. Para algunas formulaciones (por ejemplo: para usos no farmacéuticos) la cantidad del polipéptido presente puede ser pequeña, por ejemplo, de 0,01 a 10%, tal como desde 0,1 a 5%, o 2% o aún desde 0,2 a 1%.

30 Preferiblemente, el polipéptido de la invención es obtenible de un microorganismo que posee un gen que codifica una enzima con actividad de β -glucanasa (o celulosa). Más preferiblemente el microorganismo es fungoso, y óptimamente un hongo filamentoso. Los organismos preferidos son así el género *Talaromices*, tales como la especie *Talaromices emersonii*.

Actividad

35 Un polipéptido de la invención puede tener una o más de las siguientes características, a saber:

- (1) posee actividad de β -glucanasa (o celulosa),
- 40 (2) tiene un rango de pH óptimo de desde 3 a 6,5 o 7,0, tal como desde 4 a 5,5 o 6,0, óptimamente desde 4,5 a 5,0;
- (3) tiene una actividad óptima a una temperatura de desde 30°C a 100°C, tal como 60 a 95°C, óptimamente de 75°C u 80°C a 90°C. Preferiblemente la temperatura óptima es de por lo menos 75°C, tal como por lo menos 85°C;
- 45 (4) tiene un peso molecular (desglucosilado) de desde 20 a 60 kDa, preferiblemente desde 20 a 25, 35 a 45 o 23 a 50 kDa, óptimamente desde 36 a 40 kDa o (glicosilado) o desde 40 a 45 kDa;
- 50 (5) tiene un punto isoeléctrico de desde 3,0 a 3,6 o 5,0, 3,8 a 4,5, 4,5 a 5,0 o desde 6,0 a 7,0; y/o
- (6) posee actividad hidrolítica sobre el β -glucano de cereal o exhibe actividad hidrolítica por debajo de pH 7.

55 El polipéptido puede tener la actividad de EC.3.2.1.4 (o actividad endoglucanasas). En general ésta puede ser endohidrólisis de enlaces de 1,4- β -D-glucosídico en Celulosa. “La actividad de β -glucanasa” es la capacidad de dividir la celulosa o un polímero de β -glucano (por ejemplo como se encuentra en las plantas, por ejemplo, avena o cebada). La actividad permite así dividir entre unidades de glucopiranosas terminal y/o no terminal adyacentes. Preferiblemente, la división ocurre en un enlace [glucosa (1-4), (1-3) o (1-6) glucosa]. El polipéptido puede preferencialmente dividirse entre dos unidades adyacentes (por ejemplo, glucosa no sustituida). Éste puede tener así una actividad endo (es decir, ser una endoglucanasa). El polímero del sustrato puede o puede no ser sustituido. Preferiblemente el polipéptido no tendrá actividad de xilanasas.

65 El polipéptido también puede tener la actividad de celulasa, es decir es activa sobre, o puede dividir, celulosa. Como el β -glucano es un componente de la celulosa, todas las glucanasas caen dentro del término más amplio de las celulasas. Los polipéptidos de la presente invención son por lo tanto celulasas porque ellas pertenecen a las subclases de glucanasas. Otros tipos de clases de actividad dentro de las celulasas, aparte de la endoglucanasa (EC 3.2.1.4, como se mencionó anteriormente) son exo-glucanasa/celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), endo-1,6-glucanasa (EC 3.2.1.75), exo-1,3-glucanasa (EC 3.2.1.58), mananasa (EC 3.2.1.78), y endo-glicoceraniidasa (EC

ES 2 299 486 T3

3.2.1.123). Algunos de los polipéptidos se cree que tienen uno, dos o más de estas actividades adicionales con base en su estructura y secuencia, mediante la comparación con las enzimas conocidas y la familia de las hidrolasas en las cuales ellas caen. Así, en la especificación, donde el contexto es apropiado, la actividad glucanasa puede significar actividad celulasa. Una lista de actividades (celulasa) de los polipéptidos se suministra en el Ejemplo 11 posteriormente.

Preferiblemente el polipéptido cae en una de las familias 5, 7 o 45, de acuerdo con la clasificación del glicósido hidrolasa (CAZy). El polipéptido puede ser un donador de nucleófilo/protón glu/glu o asp/asp.

Variantes y Homólogos

Un polipéptido de la invención puede comprender la secuencia de aminoácido establecida en la SEQ ID No. 2 o una secuencia sustancialmente homóloga, o un fragmento de cualquier secuencia y puede tener una actividad de β -glucanasa. En general, la secuencia de aminoácido de ocurrencia natural mostrada en la SEQ ID No. 2 se prefiere.

En particular, el polipéptido de la invención puede comprender:

- a. la secuencia de polipéptido de la SEQ ID No. 2;
- b. una variante de ocurrencia natural o especies homólogas de éstas; o
- c. una proteína con por lo menos 70, por lo menos 80, por lo menos 90, por lo menos 95, por lo menos 98 o por lo menos 99% de identidad de secuencia con (a) o (b).

Una variante puede ser una que ocurra naturalmente, por ejemplo en hongos, bacterias, levaduras o células vegetales y que puedan funcionar de una manera sustancialmente similar a la proteína de la SEQ ID No. 2, por ejemplo ésta tiene una actividad de β -glucanasa. Similarmente una especie homóloga de la proteína será la proteína equivalente que ocurre naturalmente en otras especies y que pueden funcionar como un enzima de β -glucanasa. Las variantes incluyen variantes alélicas de la misma cepa que el polipéptido de la invención o de diferente cepa, pero del mismo género, o de la misma especie.

Las variantes y las especies homólogas se pueden obtener mediante los siguientes procedimientos descritos aquí para la producción del polipéptido de la SEQ ID No. 2 y desarrollar tales procedimientos sobre una fuente celular adecuada, por ejemplo una bacteria, levadura, hongo o célula vegetal. También será posible utilizar una sonda como se definió anteriormente para sondear las colecciones hechas de levadura, bacterias, hongos o células vegetales con el fin de obtener clones que incluyen las variantes o la homología de especies. Los clones se pueden manipular mediante técnicas convencionales para generar un polipéptido de la invención que se puede entonces producir mediante técnicas recombinantes o sintéticas conocidas *per se*.

El polipéptido de la invención tiene preferiblemente por lo menos 70% de identidad de secuencia con la proteína de la SEQ ID No. 2, más preferiblemente por lo menos 80%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97% o por lo menos 99% de la identidad de secuencia con ésta, por ejemplo sobre una región de por lo menos 60, por lo menos 100, 150, 200 o 300 aminoácidos contiguos o sobre la longitud completa de la SEQ ID No. 2. Para la SEQ ID No. 2, la identidad de secuencia es preferiblemente por lo menos del 70%.

La secuencia del polipéptido de la SEQ ID No. 2 y de las variantes y especies homólogas se puede modificar así para suministrar los polipéptidos de la invención. Las sustituciones de aminoácido se pueden hacer, por ejemplo de o hasta 1, 2 o 3 a 10, 20, 30, 50 o 100 sustituciones. El mismo número de supresiones e inserciones también se puede hacer. Estos cambios se pueden hacer por fuera de regiones críticas a la función del polipéptido y así pueden aún resultar en una enzima activa. El polipéptido modificado generalmente retiene la actividad como β -glucanasa.

Los polipéptidos de la invención incluyen fragmentos de los polipéptidos de longitud completa anteriormente mencionados y de las variantes de éstos, que incluyen fragmentos de la secuencia establecida en la SEQ ID No. 2. Tales fragmentos retienen típicamente la actividad como una β -glucanasa. Los fragmentos pueden ser de por lo menos 50, 100, 150, 200 o 250 aminoácidos de largo o puede ser este el número de aminoácidos corto de la secuencia de longitud completa (como se muestra en la SEQ ID No. 2).

Los polipéptidos de la invención pueden si es necesario ser producidos por medios sintéticos aunque usualmente ellos serán hechos recombinantemente como se describe adelante. Ellos se pueden modificar por ejemplo mediante la adición de residuos de histidina o una etiqueta T7 para ayudar a su identificación o purificación o mediante la adición de una secuencia de señal para promover su secreción de una célula.

El término "variantes" se refiere a los polipéptidos que tienen el mismo carácter esencial o la funcionalidad biológica básica como la β -glucanasa (o celulasa), e incluye las variantes alélicas. El carácter esencial de la β -glucanasa es que ésta es una enzima que exhibe actividad EC 3.2.1.4 o que puede dividir 1→3, 1→4 y/o 1→6 enlaces en el β -D-glucano, tal como la escanda de cereal o avena (β)-glucano. Preferiblemente un polipéptido variante tiene la misma actividad que la β -glucanasa. Un polipéptido que tiene el mismo carácter esencial que la β -glucanasa se puede identificar al utilizar un ensayo de degradación de celulosa o β -glucano, por ejemplo como se describe posteriormente.

ES 2 299 486 T3

Las variantes de la SEQ ID No. 2 también incluye secuencias que varían de la SEQ ID No. 2 pero que no necesariamente se derivan de la proteína de β -glucanasa de ocurrencia natural. Estas variantes se pueden describir por tener un % de homología de la SEQ ID No. 2 que tiene un número de sustituciones dentro de esta secuencia. Alternativamente se puede codificar una variante mediante un polinucleótido que hibrida a la SEQ ID No. 1.

Las variantes se pueden definir de manera similar a las variantes de la SEQ ID No. 1. Así las variantes pueden comprender secuencias variantes derivadas de otras cepas de *Talaromices*. Se pueden identificar otras variantes de otras cepas de *Talaromices* al buscar la actividad de β -D-glucanasa y clonar y secuenciar tal como anteriormente. Las variantes pueden incluir la supresión, modificación o adición de aminoácidos únicos o grupos de aminoácidos dentro de la secuencia de proteína, tan largos como el péptido mantenga la funcionalidad biológica básica de la β -glucanasa.

Las sustituciones conservadoras se pueden hacer, por ejemplo de acuerdo con la siguiente Tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir uno por el otro. Las sustituciones preferiblemente no afectan el doblamiento de la actividad del polipéptido.

ALIFÁTICO	No polar	G A P
		I L V
	Polar-no cargado	C S T M
		N Q
	Polar-cargado	D E
		K R
AROMÁTICO		H F W Y

Las secuencias de polipéptido más cortas están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, un péptido de por lo menos 50 aminoácidos o hasta de 60, 70, 80, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud se considera que cae dentro del alcance de la invención en tanto que éste demuestre que la funcionalidad biológica básica de la β -glucanasa. En particular, pero no exclusivamente, este aspecto de la invención comprende la situación cuando la proteína es un fragmento de la secuencia de proteína completa y puede comprender o representar una región de unión de β -D-glucano (o manosa) o una región de división de β -D-glucano (o celulosa).

Modificaciones

Los polipéptidos de la invención se pueden modificar químicamente, por ejemplo, post-transduccionalmente modificados. Por ejemplo, ellos se pueden glicosilar (una o más veces, por el mismo o diferentes azúcares) o comprender residuos de aminoácido modificados. Ellos también se pueden modificar mediante la adición de residuos de histidina (para ayudar a su purificación) o mediante la adición de una secuencia de señal (para promover la inserción en la membrana celular). El polipéptido puede tener una o más extensiones (N) amino o (C) carboxil-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un pequeño péptido ligador de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una extensión (pequeña) que facilita la purificación, tal como una poli-histidina o etiqueta T7, un epítipo antigénico o un dominio¹⁴ de unión (por ejemplo, maltosa) (por ejemplo en el terminal C). Estas extensiones pueden o no agregarse por vía de un ligador.

Un polipéptido de la invención se puede marcar con un marcador revelante. El marcador revelante puede ser cualquier marca adecuada que le permita al polipéptido ser detectado. Las marcas adecuadas incluyen radioisótopos, por ejemplo, ¹²⁵I, ³⁵S, enzimas, anticuerpos, polinucleótidos y ligadores tales como la biotina.

Los polipéptidos se pueden modificar para incluir los aminoácidos de ocurrencia no natural o para incrementar la estabilidad del polipéptido. Cuando las proteínas o péptidos se producen por medios sintéticos, tales aminoácidos se pueden introducir durante la producción. Las proteínas o los péptidos también se pueden modificar siguiendo la producción sintética o recombinante.

Los polipéptidos de la invención también se pueden producir utilizando, o comprenden, (un o más) D-aminoácidos.

Un número de modificaciones de cadena lateral se conocen en la técnica y se pueden hacer a las cadenas laterales de las proteínas o péptidos de la presente invención. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos por alquilación reductiva mediante la reacción con un aldehído seguido por la reducción con NaBH₄, la amidinación con metilacetato o la acilación con anhídrido acético.

Las secuencias suministradas por la presente invención se pueden utilizar como materiales de partida para la construcción de enzimas de "segunda generación". Las glucanasas de "segunda generación" son glucanasas, alteradas por técnicas de mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida de sitio), que tienen propiedades que difieren de

aquellas de las glucanasas tipo silvestre o de las glucanasas recombinantes tales como aquellas producidas por la presente invención. Por ejemplo, la temperatura o el pH óptimo, la actividad específica, la afinidad de sustrato o la termoestabilidad se pueden alterar con el fin de ser mejor adecuadas para la aplicación en un proceso definido.

5 Los aminoácidos esenciales a la actividad de las glucanasas de la invención, y por lo tanto preferiblemente sujetas a la sustitución, se pueden identificar de acuerdo a los procedimientos conocidos en la técnica, tal como la mutagénesis o mutagénesis¹⁰ de exploración de alanina dirigida de sitio. En la última técnica las mutaciones se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se prueban para actividad biológica (por ejemplo, actividad de glucanasa) para identificar los residuos de aminoácido que son críticos a la actividad de la molécula. Los
10 sitios de la interacción de enzima-sustrato también se pueden determinar mediante análisis de la estructura de cristal como se determinó por tales técnicas como la resonancia magnética nuclear, la cristalografía o marcación de fotoafinidad^{11,12,13} o modelamiento molecular.

15 El uso de levadura o células huéspedes fungosas se espera que suministre tales modificaciones post-transduccionales (por ejemplo, procesamiento proteolítico, miristilación, glicosilación, truncamiento, y fosforilación de tirosina, serina o treonina) como puede ser necesario para conferir la actividad biológica óptima sobre los productos de expresión recombinantes de la invención.

20 Los polipéptidos de la invención se pueden suministrar en forma tal que ellos estén por fuera de su ambiente celular natural. Así, ellos se pueden aislar o purificar sustancialmente, como se discutió anteriormente, o en una célula en la cual ellos no se presentan en la naturaleza, por ejemplo, una célula de otras especies de hongo, animales, levadura o bacteria.

25 C. Aspectos Recombinantes

La invención también suministra vectores que comprenden un polinucleótido de la invención, que incluye vectores de clonación y de expresión, y métodos de crecimiento, transformación o transfección de tales vectores en una célula huésped adecuada, por ejemplo, bajo condiciones en las cuales la expresión de un polipéptido de la invención ocurre. También se suministran células huéspedes que comprenden un polinucleótido o vector de la invención en donde el
30 polinucleótido es heterólogo al genoma de la célula huésped. El término "heterólogo", usualmente con respecto a la célula huésped, significa que el polinucleótido no ocurre de manera natural en el genoma o en la célula huésped o que el polipéptido no se produce naturalmente por esa célula. Preferiblemente, la célula huésped es una célula de levadura, por ejemplo una célula de levadura del género *Kluyveromices* o *Saccharomices* o una célula fungosa, por ejemplo del género *Aspergillus*.

35 Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar en un vector replicable recombinante, por ejemplo un vector de clonación o de expresión. El vector se puede utilizar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Así en una modalidad adicional, la invención suministra un método para elaborar polinucleótidos de la invención al introducir un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible, y haciendo crecer la célula huésped bajo condiciones que realizan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula huésped. Las células huéspedes adecuadas se describen adelante en relación con los vectores de expresión.

45 Vectores

El polinucleótido de la invención se puede insertar en un casete de expresión. El vector en el cual el casete de expresión o polinucleótido de la invención se inserta puede ser cualquier vector que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la cual se va a introducir. Así, el vector puede ser un vector autónomamente replicante, es decir, un vector que
50 existe como una entidad extra-cromosómico, cuya replicación es independiente de la replicación no cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en un genoma de célula huésped y se replica junto con el o los cromosomas a los cuales se ha integrado.

55 Preferiblemente, un polinucleótido de la invención en un vector es operablemente ligado a una secuencia regulatoria que es capaz de suministrar la expresión de la secuencia codificante por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "operablemente ligado" se refiere a la yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia regulatoria tal como un promotor, mejorador u otra señal de regulación de la expresión "operablemente ligada" a una secuencia codificante se coloca de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las
60 secuencias de control.

El vector puede ser un plásmido, cósmico, virus o vector fago, usualmente suministrado con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del polinucleótido y opcionalmente un mejorador y/o un regulador del promotor. Una secuencia terminadora puede estar presente, como puede ser una secuencia de poliadenilación. El
65 vector puede contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia de ampicilina (en el caso de un plásmido bacteriano) o un gen de resistencia a la neomicina (para un vector de mamífero). Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo, para la producción del ARN o utilizado para transfectar o transformar una célula huésped. Ellos pueden comprender dos o más polinucleótidos de la invención, por ejemplo para sobreexpresión.

ES 2 299 486 T3

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido se introduce preferiblemente en un huésped adecuado como parte de un casete de expresión (o construcción) en la cual la secuencia de ADN está operablemente ligada a las señales de expresión que son capaces de dirigir la expresión de la secuencia de ADN en las células huéspedes. Para la transformación del huésped adecuado con la construcción de expresión están disponibles los procedimientos de transformación que son bien conocidos por la persona experta^{3,4}. La construcción de la expresión se puede utilizar para la transformación del huésped como parte de un vector que lleva un marcador seleccionable, o la construcción de expresión se puede co-transformar como una molécula separada junto con el vector que lleva un marcador seleccionable. El vector puede comprender uno o más genes marcadores seleccionables.

Los marcadores^{15,16} seleccionables preferidos incluyen pero no están limitados a aquellos que complementan un defecto en la célula huésped o confieren resistencia a una droga. Ellos incluyen por ejemplo, genes marcadores versátiles que se pueden utilizar para la transformación de la mayoría de hongos filamentosos y levaduras tales como los genes de acetamidasa o los cADN (los genes *amdS*, *niaD*, *facA* o los cADN de *A. nidulans*, *A. oryzae*, o *A. niger*), o genes que suministran resistencia a antibióticos como resistencia al G418, higromicina, bleomicina, canamicina, fleomicina o benomilo (*benA*). Alternativamente, los marcadores de selección específicos se pueden utilizar tales como marcadores auxotrópicos que requieren las correspondientes cepas huéspedes mutantes: por ejemplo, *URA3* (de *S. cerevisiae* o genes análogos de otras levaduras), *pyrG* o *pyrA* (de *A. nidulans* o *A. niger*), *argB* (de *A. nidulans* o *A. niger*) o *trpC*. En una modalidad preferida el marcador de selección se suprime de la célula huésped transformada después de la introducción de la construcción de expresión con el fin de obtener células huéspedes transformadas capaces de producir el polipéptido que es libre de los genes^{21,22} marcadores de selección.

Otros marcadores incluyen la ATP sintetasa, subunidad 9 (*oilC*), orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa (*pvrA*), el gen de resistencia al G418 bacteriano (esto también se puede utilizar en levaduras, pero no en hongos), el gen de resistencia a la ampicilina (*E. coli*), el gen de resistencia a la neomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA* de *E. coli*, codificando para la β -glucuronidasa (*GUS*). Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizar para transfectar o transformar una célula huésped.

Para la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras, el vector o la construcción de expresión se integra preferiblemente en el genoma de la célula huésped con el fin de obtener transformantes estables. Sin embargo, para ciertas levaduras también están disponibles vectores episómicos adecuados en los cuales la construcción de expresión se puede incorporar para la expresión estable y de alto nivel, ejemplos de éstos incluyen vectores derivados de los plásmidos 2μ y *pKD1* de *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*, respectivamente, o vectores que contienen una secuencia *AMA* (por ejemplo, *AMA 1* de *Aspergillus*^{3,20}). En el caso de que construcciones de expresión estén integradas en el genoma de las células huéspedes, las construcciones están integradas en los locus aleatorios en el genoma, o en locus objetivo predeterminado que utilizan recombinación homóloga, en cuyo caso el locus objetivo comprende preferiblemente un gen altamente expresado. Un gen altamente expresado es un gen cuyo mARN puede ser hasta de por lo menos 0,01% (p/p) del mARN celular total, por ejemplo, bajo condiciones inducidas, o alternativamente, un gen cuyo producto de gen puede hacer hasta por lo menos 0,2% (p/p) de la proteína celular total, o, en caso del producto de gen secretado, se puede secretar a un nivel de por lo menos 0,05 g/l. Numerosos ejemplos de genes altamente expresados adecuados se suministran adelante.

Un vector o construcción de expresión para una célula huésped dada puede comprender los siguientes elementos operablemente ligados uno al otro en un orden consecutivo desde el extremo 5' al extremo 3' con relación a la cadena codificante de la secuencia del polipéptido de la primera invención.

- (1) una secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido en la célula huésped dada.
- (2) Opcionalmente, una secuencia de señal capaz de dirigir la secreción del polipéptido de la célula huésped dada en un medio de cultivo;
- (3) Una secuencia de ADN que codifica una forma madura y preferiblemente activa del polipéptido; y preferiblemente también
- (4) Una región de terminación de transcripción (terminador) capaz de terminar la transcripción corriente debajo de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

Corriente debajo de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido puede haber una región no traducida 3' que contiene uno o más sitios de terminación de transcripción (por ejemplo, un terminador). El origen del terminador es menos crítico. El terminador puede, por ejemplo, ser nativo a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Sin embargo, preferiblemente un terminador de levadura se utiliza en las células huéspedes de levadura y un terminador fungoso filamentososo se utiliza en células huéspedes fungosas filamentosas. Más preferiblemente el terminador es endógeno a la célula huésped (en la cual la secuencia de ADN que codifica al polipéptido se va a expresar).

La expresión mejorada del polinucleótido que codifica el polipéptido de la invención también se puede lograr por medio de la selección de regiones regulatorias heterólogas, por ejemplo, las regiones promotora, de secreción líder y/o terminadora, que puede servir para incrementar la expresión y, si se desea, los niveles de secreción de la proteína de

ES 2 299 486 T3

interés proveniente del huésped de expresión y/o suministrar para el control inducible de la expresión del polipéptido de la invención.

5 A parte del promotor nativo del gen que codifica el polipéptido de la invención, otros promotores se pueden utilizar para dirigir la expresión del polipéptido de la invención. El promotor se puede seleccionar por su eficiencia en dirigir la expresión del polipéptido de la invención en el huésped de expresión deseado.

10 Los promotores/mejoradores y otras señales de regulación de expresión se pueden seleccionar para ser compatibles con la célula huésped para la cual se diseña el vector de expresión. Por ejemplo, los promotores procarióticos se pueden utilizar, en particular aquellos adecuados para uso en cepas de *E. coli*. Cuando la expresión se lleva a cabo en células de mamífero, se pueden utilizar los promotores de mamífero. Los promotores específicos de tejido, por ejemplo los promotores específicos de célula de hepatocito, también se pueden utilizar. Los promotores virales también se pueden utilizar, por ejemplo la repetición terminal larga del virus de leucemia de murino Moloney (MML LTR), el promotor del virus de sarcoma rous promotor (RSV) LTR, el promotor SV40 (por ejemplo, el antígeno T largo), el promotor de citomegalovirus humano (CMV) IE, los promotores del virus herpes simplex o los promotores de adenovirus, los promotores HSV tales como los promotores HSV IE, o los promotores HPV, particularmente la región reguladora corriente arriba HPV (URR). Los promotores de levadura incluyen *S. cerevisiae* GAL4 y los promotores ADH, el promotor *S. pombe* nmt 1 y adh. Los promotores de mamíferos incluyen el promotor de metalotioneína que se puede inducir en respuesta a metales pesados tales como promotores de cadmio y β -actina. Los promotores específicos de tejido, en particular los promotores específicos de célula endotelial o neuronal (por ejemplo los promotores DDAHI y DDAHII), son especialmente preferidos.

25 Una variedad de promotores^{15,16} se pueden utilizar que sean capaces de dirigir la transcripción en las células huéspedes de la invención. Preferiblemente la secuencia promotora se deriva de un gen altamente expresado como se definió previamente. Ejemplos de genes altamente expresados preferidos de los cuales los promotores se derivan preferiblemente y/o que están comprendidos en los locus objetivos predeterminados preferidos para la integración de construcciones de expresión, incluyen pero no están limitados a genes que codifican enzimas glicolíticas tales como isomerasas triosa-fosfato (TPI), deshidrogenasas gliceraldehído-fosfato (GAPDH), fosfo-glicerato quinasa (PGK), piruvato quinasa (PYK), alcohol deshidrogenadas (ADH), así como también los genes que codifican amilasas, glucoamilasas, proteasas, xilanasas, celobiohidrolasas, β -galactosidasas, alcohol (metanol) oxidasas, factores de elongación y proteínas ribosomales. Ejemplos específicos de los genes altamente expresado incluye por ejemplo, el gen LAC4 de *Kluyveromyces sp.*, los genes de metanol oxidasa (AOX y MOX) de *Hansenula* y *Pichia*, respectivamente, los genes de glucoamilasa (glaA) de *A. niger* y *a. awamori*, el gen de TAKA-amilasa de *A. oryzae*, el gen de gpdA de *A. nidulans* y los genes de celubiohidrolasa de *T. reesei*.

35 Ejemplos de promotores constitutivos y/o inducibles fuertes que son preferidos para uso en huéspedes^{15,16} de expresión fungosa son aquellos que obtenibles de los genes fungosos para xilanasas (xlnA), fitasa, ATP-sintetasa, la subunidad 9 (oilC), la triosa fosfato isomerasa (tpi), alcohol deshidrogenasa (AdhA), α -amilasa (amy), amiloglicosidasa (AG proveniente del gen glaA), acetamidasa (amdS) y los promotores de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gpd).

Ejemplos de promotores de levadura fuertes son aquellos obtenibles de los genes de alcohol deshidrogenasa, lactasa 3-fosfoglicerato quinasa y triosefosfato isomerasa.

45 Ejemplos de promotores bacterianos fuertes son la α -amilasa y los promotores SPo2 así como también los promotores de los genes de proteasa extracelular.

50 Los promotores adecuados de las células vegetales incluyen napalina sintasa (nos), octopina sintasa (ocs), manopina sintasa (mas), subunidad pequeña de ribulosa (rubisco ssu), histona, actina de arroz, faseolina, virus del mosaico del coliflor (CMV) 35S y 19S y los promotores circovirus. Todos estos promotores están disponibles en la técnica.

55 El vector puede incluir además secuencias que flanquean el polinucleótido dando origen a ARN que comprende secuencias homólogas a las secuencias genómicas eucarióticas, preferiblemente las secuencias genómicas de mamífero, o las secuencias genómicas virales. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención en el genoma de las células eucarióticas o los virus de recombinación homóloga. En particular, un vector plásmido que comprende el casete de expresión flanqueado por las secuencias virales se puede utilizar para preparar un vector viral adecuado para el suministro de los polinucleótidos de la invención a una célula de mamífero. Otros ejemplos de vectores virales adecuados incluyen los vectores virales de herpes simplex^{18,19}, y los retrovirus, incluyendo los lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociados y virus HPV (tales como HPV-16 o HPV-18). Las técnicas de transferencia de gen que utilizan estos virus se conocen por aquellos expertos en la técnica. Los vectores de retrovirus por ejemplo se pueden utilizar para integrar establemente el polinucleótido que da origen a un ARN antisentido en el genoma huésped. Los vectores de adenovirus defectuosos de replicación por contraste (permanecen episómicos y permiten por lo tanto la expresión transitoria).

65 El vector puede contener un polinucleótido de la invención orientado en una dirección contrasentido para suministrar la producción de ARN contrasentido. Éste se puede utilizar para reducir, si se desea, los niveles de expresión del polipéptido.

Células Huéspedes y Expresión

En un aspecto adicional la invención suministra un proceso para preparar un polipéptido de acuerdo con la invención que comprende cultivar una célula huésped (por ejemplo, transformada o transfectada con un vector de expresión como se describió anteriormente) bajo condiciones para suministrar para la expresión (por el vector) de una secuencia codificante que codifica el polipéptido, y opcionalmente recuperar el polipéptido expresado. Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar en un vector replicable recombinante, por ejemplo, un vector de expresión. El vector se puede utilizar para replicar el ácido nucleico en una célula huésped compatible. Así en una modalidad adicional, la invención suministra un método para elaborar un polinucleótido de la invención al introducir un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula huésped compatible, y haciendo crecer la célula huésped bajo condiciones que efectúen la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula huésped. Las células huéspedes adecuadas incluyen bacterias tales como *E. coli*, levadura, líneas celulares de mamífero y otras líneas celulares eucarióticas, por ejemplo, células de insecto tales como células Sf9 y células fungosas (por ejemplo, filamentosas).

Preferiblemente el polipéptido se produce como una proteína secretada en cuyo caso la secuencia de ADN que codifica una forma madura del polipéptido en la construcción de expresión está operablemente ligada a la secuencia de ADN que codifica una secuencia de señal. Preferiblemente la secuencia de señal es nativa (homóloga) a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Alternativamente la secuencia de señal es extraña (heteróloga) a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido, en cuyo caso la secuencia de señal es preferiblemente endógena a la célula huésped en la cual la secuencia de ADN se expresa. Ejemplos de secuencias de señal adecuadas para las células huéspedes de levadura son las secuencias de señal derivadas de los genes del factor α de levadura. Similarmente, la secuencia de señal adecuada para las células huéspedes fungosas filamentosas es por ejemplo, una secuencia de señal derivada del gen de amiloglucosidasa fungosa filamentososa (AG), por ejemplo, el gen *glaA* de *A. niger*. Ésta se puede utilizar en combinación con el promotor de amiloglucosidasa mismo (también denominada (gluco)amilasa), así como también en combinación con otros promotores. Las secuencias de señal híbrida también se pueden utilizar en el contexto de la presente invención.

Las secuencias líderes de secreción heteróloga preferidas son aquellas que se originan del gen de amiloglucosidasa fungoso (AG) (*glaA* - tanto versiones de 18 como de 24 aminoácidos, por ejemplo de *Aspergillus*), el gen del factor α (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o el gen de α -amilasa (*Bacillus*).

Los vectores se pueden transformar o transfectar en una célula huésped adecuada como se describió anteriormente para suministrar para la expresión de un polipéptido de la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula huésped transformada con un vector de expresión como se describió anteriormente bajo condiciones para suministrar, para la expresión por el vector, una secuencia codificante que codifica el polipéptido.

Un aspecto adicional de la invención suministra así células huéspedes transformadas o transfectadas con o que comprenden un polinucleótido o vector de la invención. Preferiblemente el polinucleótido se lleva en un vector para la replicación y expresión del polinucleótido. Las células se escogerán para ser compatibles con dicho vector y pueden por ejemplo ser procarióticas (por ejemplo bacterianas), fungosas, de levadura o células vegetales.

Un huésped heterólogo también se puede escoger en donde el polipéptido de la invención se produce en la forma que sea sustancialmente libre de otras enzimas degradantes de celulosa. Esto se puede lograr al escoger un huésped que normalmente no produzca enzimas tales como *Kluyveromyces lactis*.

La invención comprende procesos para la producción del polipéptido de la invención por medio de la expresión recombinante de una secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Para este propósito la secuencia de ADN de la invención se puede utilizar para la amplificación del gen y/o el intercambio de las señales de expresión, tales como los promotores, las secuencias de señal de secreción, con el fin de permitir la producción económica del polipéptido en una célula huésped homóloga o heteróloga. Una célula huésped homóloga se define aquí como una célula huésped que es de la misma especie o que es una variante dentro de las mismas especies que las especies de las cuales se deriva la secuencia de ADN.

Las células huéspedes adecuadas son preferiblemente microorganismos procarióticos tales como bacterias, o más preferiblemente organismos eucarióticos, por ejemplo, hongos, tales como levaduras u hongos filamentosos, o células vegetales. En general, las células de levadura se prefieren sobre las células fungosas porque ellas son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son pobremente secretadas de levaduras, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en levadura). En estos casos, se debe seleccionar un organismo huésped fungoso.

La célula huésped puede sobre-expresar el polipéptido, y las técnicas para trabajar por ingeniería sobre-expresión son bien conocidas³. El huésped puede tener así dos o más copias del polinucleótido codificante (y el vector puede así tener dos o más copias de acuerdo con esto).

Las bacterias provenientes del género *Bacillus* son muy adecuadas como huéspedes heterólogos por su capacidad a secretar proteína en el medio de cultivo. Otras bacterias incluyen como huéspedes aquellas del género *Streptomyces* y *Pseudomonas*. Una célula huésped de levadura preferida para la expresión de la secuencia de ADN que codifica

el polipéptido es del género *Saccharomices*, *Kluyveromices*, *Hansenula*, *Pichia*, *Yarrowia*, y *Schizosaccharomices*. Más preferiblemente una célula huésped de levadura se selecciona del grupo que consiste de las especies *Saccharomices cerevisiae*, *Kluyveromices lactis* (también conocida como *Kluyveromices marxianus* var. *Lactis*), *Hansenula polymorpha*, *Pifia pastoris*, *Yarrowia lipolitica*, y *Schizosaccharomices pombe*.

Más preferidas son, sin embargo, las células huéspedes fungosas (por ejemplo, filamentosas). Las células huéspedes fungosas filamentosas preferidas son aquellas seleccionadas del grupo que consiste del género *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Disporotrichum*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Neurospora*, *Thermoascus*, *Micelioftora*, *Sporotrichum*, *Thielavia*, y *Talaromices*. Más preferiblemente una célula huésped fungosa filamentosa es de las especies *Aspergillus oysae*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus nidulans*, o unas especies del Grupo *Aspergillus niger* (como se define por Raper y Fennell, *The Genus Aspergillus*, The Willams & Wilkins Company, Baltimore, pp 293-344, 1965). Estos incluyen pero no están limitados a *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus tubigensis*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus japonius*, *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus ficuum*, y además consisten de especies de *Trichoderma reesei*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrysogenum*, *Acremonium alabamense*, *Neurospora crassa*, *Micelioftora thermofilum*, *Sporotrichum cellulofilum*, *Disporotrichum dimorfosporum* y *Thielavia terrestris*.

Ejemplos de los huéspedes de expresión preferidos dentro del alcance de la presente invención son hongos tales como las especies de *Aspergillus* (descritas en la EP-A-184.438 y la EP-A-284.603) y las especies de *Trichoderma*; bacterias tales como las especies de *Bacillus* (descritas en la EP-A-134.048 y la EP-A-253.455), por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amiloliquefaciens*, especies de *Pseudomonas*; y levaduras tales como especies de *Kluyveromices* (descritas en la EP-A-096.430, por ejemplo, *Kluyveromices lactis* en la EP-A-301.670) y especies de *Saccharomices*, por ejemplo, *Saccharomices cerevisiae*.

Las células huéspedes de acuerdo con la invención incluyen células vegetales, y la invención se extiende por lo tanto a organismos transgénicos, tales como plantas y partes de éstas, que contienen una o más células de la invención. Las células pueden expresar heterológamente el polipéptido de la invención o pueden contener heterológamente uno o más polinucleótidos de la invención. La planta transgénica (o genéticamente modificada) por lo tanto puede tener insertada (por ejemplo, establemente) en su genoma una secuencia que codifica uno o más de los polipéptidos de la invención. La transformación de las células vegetales se puede desarrollar utilizando técnicas conocidas, por ejemplo utilizando un plásmido Ti o Ri de *Agrobacterium tumefaciens*. El plásmido (o vector) puede contener así secuencias necesarias para infectar una planta, y se pueden emplear derivados de los plásmidos Ti y/o Ri.

Alternativamente la infección directa de una parte de una planta, tal como una hoja, raíz o tallo se puede efectuar. En esta técnica la planta a ser infectada se puede herir, por ejemplo al cortar la planta con una cuchilla o punzar la planta con una aguja o frotar la planta con un abrasivo. La herida es inoculada entonces con el *Agrobacterium*. La planta o la parte de la planta se puede entonces hacer crecer sobre un medio de cultivo adecuado y se le permite desarrollarse hasta planta madura. La regeneración de las células transformadas en plantas genéticamente modificadas se puede lograr al utilizar técnicas conocidas, por ejemplo al seleccionar brotes transformados utilizando un antibiótico y al sub-cultivar los brotes en un medio que contiene los nutrientes apropiados, las hormonas de planta y similares¹⁷.

Cultivos de células huéspedes y producción recombinante

La invención también incluye células que se han modificado para expresar la β -glucanasa o una variante de ésta. Tales células incluyen líneas celulares eucarióticas superiores, transitorias, o preferiblemente estables, tales como células de mamífero o células de insecto, células eucarióticas inferiores, tales como levadura y células fungosas (por ejemplo, filamentosas) o células procarióticas tales como células bacterianas.

También es posible para las proteínas de la invención ser expresadas transitoriamente en una línea celular o sobre una membrana, tal como por ejemplo en un sistema de expresión de baculovirus. Tales sistemas, que se adaptan para expresar las proteínas de acuerdo con la invención, también se incluyen dentro del alcance de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, la producción del polipéptido de la invención se puede efectuar al cultivar los huéspedes de expresión microbiano, que han sido transformados con uno o más polinucleótidos de la presente invención, en un medio de fermentación de nutriente convencional.

Las células huéspedes recombinantes de acuerdo con la invención se pueden cultivar utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Para cada combinación de un promotor y una célula huésped, la condición de cultivo está disponible las cuales conducen a la expresión de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Después de alcanzar la densidad o el título de célula deseado del polipéptido el cultivo se detiene y el polipéptido se recupera utilizando procedimientos conocidos.

El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contiene una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa, maltosa, molasas, celulosa, β -glucano, etc.), una fuente de nitrógeno (por ejemplo, sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc.); una fuente de nitrógeno orgánico (por ejemplo, extracto de levadura, extracto de malta, peptona, etc.) y fuentes de nutrientes inorgánicas (por ejemplo, fosfato, magnesio, potasio, zinc, hierro, etc.). Opcionalmente, se puede incluir un inductor (por ejemplo, celulosa, β -glucano, maltosa o maltodextrina).

La selección del medio apropiado se puede basar en la elección del huésped de expresión y/o basar en los requisitos regulatorios de la construcción de expresión. Tales medios se conocen por aquellos expertos en la técnica. El medio puede, si se desea, contener los componentes adicionales que favorecen los huéspedes de expresión transformados sobre otros microorganismos potencialmente contaminantes.

5

La fermentación se puede desarrollar durante un período de 0,5-30 días. Ésta puede ser en procesos en tanda, continuos o alimentados en tanda, adecuadamente a una temperatura en el rango de entre 0 y 45°C y, por ejemplo, a un pH entre 2 y 10. Las condiciones de fermentación preferidas son una temperatura en el rango de entre 20 y 37°C y/o un pH entre 3 y 9. Las condiciones apropiadas son usualmente seleccionadas con base en la elección del huésped de expresión y la proteína a ser expresada.

10

Después de la fermentación, si es necesario, las células se pueden remover del caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Después de que la fermentación se ha detenido o después de la remoción de las células, el polipéptido de la invención se puede recuperar y, si se desea, purificar y aislar por medios convencionales.

15

D. Usos de los polipéptidos y métodos de procesar la planta o materiales que contienen celulosa

Los polipéptidos de la invención que poseen actividad de β -glucanasa (o celulasa) se pueden utilizar para tratar material fungoso o vegetal que incluye pulpa vegetal y extractos vegetales. Por ejemplo, ellos se pueden utilizar para tratar cereales, vegetales, frutas o extractos de éstas. Ellos también se pueden utilizar en composiciones de lavado (líquido o sólido, por ejemplo, polvo) y/o en composiciones detergentes. Convenientemente el polipéptido de la invención se combina con portadores o diluyentes adecuados (sólidos o líquidos) que incluyen amortiguadores para producir una preparación de composición/enzima. El polipéptido se puede unir a o mezclar con un portador, por ejemplo, un portador inmovilizado sobre uno sólido. Así la presente invención suministra en un aspecto adicional una composición que comprende un polipéptido de la invención. Esto puede estar en una forma adecuada para empaque, transporte y/o almacenamiento, preferiblemente donde se retiene la actividad glucanasa. Las composiciones incluyen pasta, líquido, emulsión, polvo, hojuelas, gránulos, pelmazos u otras formas de extruidos.

20

25

La composición puede comprender además ingredientes adicionales tales como una o más enzimas, por ejemplo, pectinasas, que incluyen una (por ejemplo, endo-arabinasa y ramnogalacturonasa, otras celulasas, xilanasas, galactanasas, manasas y/o xiloglucanasas. El polipéptido es típicamente establemente formulado en forma líquida o seca. Típicamente, el producto se hace como una composición que opcionalmente incluirá, por ejemplo, un amortiguador y/o conservante estabilizante. Las composiciones también pueden incluir otras enzimas capaces de digerir material o celulosa vegetal, por ejemplo otras celulasas, por ejemplo, (β -D-)glucanasas. Para ciertas aplicaciones, la inmovilización de la enzima sobre una matriz sólida o la incorporación sobre o en partículas portadoras sólidas se puede preferir. La composición también puede incluir una variedad de otras enzimas degradantes de material vegetal, por ejemplo, (otras) celulasas y otras pectinasas.

30

35

Los polipéptidos y composiciones de la invención se pueden utilizar por lo tanto en un método de procesar material vegetal para degradar o modificar los constituyentes de celulosa (por ejemplo, β -D-glucano) de las paredes celulares de la planta o material fungoso. Así en un aspecto adicional, la presente invención suministra un método para degradar o modificar una célula vegetal o celulosa cuyo método comprende poner en contacto la planta, la célula fungosa o la celulosa con un polipéptido o composición de la invención.

40

45

La invención suministra también un método de procesar un material vegetal cuyo método comprende poner en contacto el material vegetal con un polipéptido o composición de la invención para degradar o modificar la celulosa en el material vegetal. Preferiblemente el material vegetal es una pulpa vegetal o un extracto de planta.

En particular, la degradación preferiblemente comprende dividir las subunidades de β -glucano de un componente de celulosa de la pared de la célula vegetal. El material vegetal es preferiblemente un cereal, vegetal, fruta o vegetal o pulpa o extracto de fruta. La presente invención suministra además un material vegetal procesado obtenible al poner en contacto un material vegetal con un polipéptido o composición de la invención.

50

La presente invención también suministra un método para reducir la viscosidad de un extracto de planta cuyo método comprende poner en contacto el extracto de planta con un polipéptido o composición de la invención en una cantidad efectiva para degradar la celulosa (o β -D-glucano) contenida en el extracto vegetal.

55

La planta y los materiales que contienen celulosa incluyen pulpa vegetal, partes de planta y extractos de plantas. En el contexto de esta invención un extracto de un material vegetal es cualquier sustancia que se pueda derivar del material vegetal mediante la extracción (mecánica y/o química), procesado o por otras técnicas de separación. El extracto puede ser jugo, néctar, base, o concentrados hechos de éstos. El polipéptido se puede utilizar en licuefacción (por ejemplo, total) y/o maceración (avanzada), por ejemplo, para preparar jugos (de fruta). El material vegetal puede comprender o ser derivado de vegetales, por ejemplo, zanahorias, apio, cebollas, legumbres o plantas leguminosas (soja, fríjol de soja, alverjas) o frutas, por ejemplo, pomos o frutas de semilla (manzanas, peras, membrillo, etc.), uvas tomates, cítricos (naranja, limón, lima, mandarina), melones, ciruelas, cerezas, grosellas negras, grosellas rojas, frambuesas, fresones, arándanos, piña y otras frutas tropicales, árboles y partes de éstos (por ejemplo, polen, provenientes de árboles pino), o cereales (avena, cebada, trigo, maíz, arroz).

60

65

ES 2 299 486 T3

Los polipéptidos de la invención se pueden así utilizar para tratar material vegetal que incluye pulpa vegetal y extractos vegetales. Ellos también se pueden utilizar para tratar alimentos líquidos y sólidos o ingredientes de alimentos comestibles.

5 Típicamente, los polipéptidos de la invención se utilizan como una preparación de composición/enzima como se describió anteriormente. La composición generalmente se agregará a la pulpa vegetal obtenible mediante, por ejemplo procesamiento mecánico tal como macerar o moler material de planta. La incubación de la composición con la planta típicamente será llevada a cabo durante un tiempo de 10 minutos a 5 horas, tal como 30 minutos a 2 horas, preferiblemente durante aproximadamente 1 hora. La temperatura de procesamiento es preferiblemente 10-55°C, por ejemplo, de 15 a 25°C, óptimamente aproximadamente 20°C y uno puede utilizar 10-300 g, preferiblemente 30-70 g, 10 óptimamente aproximadamente 50 g de enzima por tonelada de material a ser tratado. Todas la o las enzimas o sus composiciones utilizadas se pueden agregar secuencialmente o al mismo tiempo a la pulpa vegetal. Dependiendo de la composición de preparación de la enzima del material vegetal se puede primero macerar (por ejemplo, a un puré) o 15 licuificar. Utilizando los polipéptidos de los parámetros de procesamiento de la invención tal como el rendimiento de la extracción, viscosidad del extracto y/o la calidad del extracto se pueden mejorar.

Alternativamente, o además de lo anterior, el polipéptido de la invención se puede agregar a un jugo bruto obtenido de presionar o licuificar la pulpa vegetal. El tratamiento del jugo de materia prima se llevará a cabo de una manera similar a la pulpa vegetal con respecto a la dosis, temperatura y tiempo de mantenimiento. De nuevo, se pueden incluir 20 otras enzimas tales como aquellas que se discutieron previamente. Las condiciones de incubación típicas son como se describe en el párrafo previo. Una vez que el jugo de materia prima se ha incubado con los polipéptidos de la invención, el jugo es luego centrifugado o (ultra)filtrado para producir el producto final.

Una composición que contiene un polipéptido de la invención también se puede utilizar durante la preparación de 25 purés de fruta o vegetal.

El polipéptido de la invención también se puede utilizar en fabricación de cerveza, elaboración de vino, destilados u horneados. Se puede por lo tanto utilizar en la preparación de bebidas alcohólicas tales como vino y cerveza, por ejemplo para mejorar la filtrabilidad o claridad del vino. Al hornear el polipéptido se puede mejorar la estructura de la masa, modificar su pegajosidad o flexibilidad, mejorar el volumen de mendrugo y/o la estructura de la migaja. 30

El polipéptido de la invención se puede utilizar en fabricación de cerveza. En la fabricación de cerveza, pueden surgir problemas de filtración en "mash-bills", que incluyen maltas sobre modificadas, debido a la presencia de β -glucanos liberados a altas temperaturas. La reducción en la velocidad de la filtración del mosto puede ser uno de los principales problemas encontrados. Los problemas adicionales son la estabilidad coloidal y la formación de turbiedades en la cerveza terminada. Éstos se pueden originar por los mismos complejos de carbohidrato, especialmente durante el madurado de alta gravedad. Los polipéptidos de la invención pueden ser capaces de mejorar la filtrabilidad del mosto, por ejemplo después de maceramiento. De esta manera, se puede retener menos licor de mosto en los granos gastados, y el rendimiento del extracto se puede mejorar. Una filtración más eficiente puede resultar en un incremento de la eficiencia del madurador. Así, en general, los polipéptidos de la invención se pueden utilizar para mejorar la 40 filtrabilidad o la tasa de filtración de la cerveza (por ejemplo, terminada).

Los polipéptidos de la invención también pueden evitar o por lo menos mitigar la formación de turbiedad durante la elaboración de la cerveza. Los β -glucanos encontrados en las paredes del endosperma de los cereales se pueden 45 llevar a la cerveza terminada. Esto puede originar turbiedad y pérdida de claridad, los polipéptidos de la invención puede evitar o por lo menos mitigar la acumulación de partículas debido a la hidrólisis de β -glucano. De esta manera los polipéptidos de la invención también se pueden utilizar para incrementar la estabilidad coloidal de la cerveza (por ejemplo, terminada).

Los polipéptidos encuentran uso en un número de áreas industriales debido a su actividad glucanasa. Estos pueden incluir no solamente producción de alcohol, sino también biometanación, en la elaboración de pan y el horneado, en higiene dental (por ejemplo composiciones dentales u orales), en el tratamiento de telas, prendas o elaboración de cueros, en la elaboración de papel, en farmacéuticos, en té, en la preparación o el tratamiento de textiles, en las composiciones detergentes o de lavado, y en el tratamiento de desperdicios. Un aspecto de la invención es por lo tanto 55 un alimento o sustancia alimenticia que comprende el polipéptido, tal como una bebida alcohólica, pan, masa o té. El polipéptido se puede formular en composiciones adecuadas para cualquiera de estos usos. El polipéptido puede estar presente en una composición acuosa (por ejemplo, agua caliente) preferiblemente con uno o más fungicidas, con el fin de tratar el material vegetal (por ejemplo, bulbos), especialmente para controlar insectos parásitos, garrapatas y nemátodos. 60

Como los polipéptidos de la invención pueden degradar el glucano éste se puede agregar a alimentos o materias alimenticias (por ejemplo, por el consumo de humanos). Es conocido que el β -D-glucano soluble se asocia con la disminución del colesterol y triglicéridos del suero, y por lo tanto los polipéptidos de la invención se pueden utilizar para niveles inferiores del colesterol y los triglicéridos en humanos o animales, por ejemplo individuos hiperlipémicos. La invención incluye por lo tanto composiciones farmacéuticas y veterinarias que comprenden el polipéptido de la invención y el portador farmacéutica o veterinariamente aceptable. Los polipéptidos se pueden así utilizar en la elaboración de un medicamento para evitar o tratar la hiperlipidemia, o niveles de colesterol y triglicéridos altos en el suero o los trastornos que resultan de éstos. 65

Los polipéptidos de la invención también pueden desplegar actividad anti-fungosa. Ellos pueden ser capaces de degradar las paredes celulares fungosas, y así se pueden emplear para la lisis de pared celular fungosa, con el fin de abrir las células. Esto puede liberar las proteínas intracelulares. De esta manera los polipéptidos se pueden utilizar para preparar levaduras y/o extractos fúngicos.

5 E. Alimentos Animales

La invención adicionalmente se relaciona con materias de alimento o composiciones de alimentos animales que comprenden uno o más polipéptidos de la invención. El polipéptido puede estar presente en la alimentación a concentraciones diferentes de su concentración natural. Las cantidades preferidas son desde 0,1 a 100, tal como 0,5 a 50, preferiblemente 1 a 10, mg por kg de alimento.

La invención también se relaciona con un proceso para la preparación de una composición de alimento animal. El proceso comprende agregar una o más sustancias de alimento comestibles o ingrediente(s) a un polipéptido de la invención. Los polipéptidos se pueden agregar a la composición de alimento animal separadamente de las sustancias o ingredientes de alimentación, individualmente o en combinación con otros aditivos de alimento. El polipéptido puede ser una parte integral de una de las sustancias o ingredientes alimenticios.

Los polipéptidos de la invención también se pueden agregar a los alimentos animales ricos en celulosa para mejorar la descomposición de la pared de la célula vegetal que conduce a una utilización mejorada de los nutrientes vegetales por el animal. Los polipéptidos de la invención se pueden agregar al alimento o ensilaje si se pre-embeben con dietas húmedas que son las preferidas. Ventajosamente, los polipéptidos de la invención pueden continuar degradando la celulosa en el alimento *in vivo*. Los polipéptidos derivados de hongos de la invención en particular generalmente tienen un pH óptimo y son capaces de liberar importantes nutrientes en tales ambientes ácidos como el estómago de un animal. La invención también contempla así alimentos o materias permitidas (por ejemplo, animales) que comprenden uno o más polipéptidos de la invención.

Los polipéptidos de la invención también se pueden utilizar durante la producción de sustituyentes de leche (o reemplazadores) de fríjol de soja. Estos sustituyentes de leche se pueden consumir tanto por humanos como animales. Un problema típico durante la preparación de estos sustituyentes de leche es la alta viscosidad de la suspensión de fríjol de soja, que resulta en la necesidad de una dilución indeseada de la suspensión a una concentración de sólidos secos de 10 a 15%. Una preparación de enzima que contiene un polipéptido de la invención se puede agregar a, o durante el procesamiento de, la suspensión, posibilitando el procesamiento a una concentración más alta (típicamente 40 a 50%) de sólidos secos. La enzima también se puede utilizar en la preparación de producto(s) de tomillo, por ejemplo, proveniente de fríjol de soja.

La composición puede comprender adicionalmente (particularmente cuando se formula para uso en alimento animal) uno o más ionóforos, agentes de oxidación, tensoactivos, aminoácidos protegidos de rumen, enzimas mejoradoras o enzimas que se pueden producir naturalmente en el tracto gastrointestinal de los animales a ser alimentados.

Cuando se agregan a los alimentos (incluyendo el silaje) para los rumiantes o animales mono-gástricos (por ejemplo, pollos o cerdos) los alimentos pueden comprender cereales tales como cebada, trigo, maíz, centeno o avenas o subproductos de cereales tales como salvado de trigo o salvado de maíz, u otros materiales vegetales tales como frijoles de soja y otras leguminosas. La enzima(s) puede mejorar significativamente la descomposición de las paredes celulares vegetales que conducen a una mejor utilización de los nutrientes de la planta por los animales. Como consecuencia, la tasa de crecimiento y/o la conversión de alimento se pueden mejorar. Los polipéptidos de la invención se pueden agregar al alimento (directamente o como un aditivo o ingrediente) o se puede agregar en su lugar celulosa tratada (por ejemplo, glucano).

Un método particularmente preferido para la adición (exógena) de la β -glucanasa es agregar al polipéptido de la invención como material vegetal transgénico y/o semilla (por ejemplo, transgénica). El polipéptido puede haber sido así sintetizado a través de una expresión de gen heteróloga, por ejemplo el gen que codifica la enzima deseada se puede clonar en un vector de expresión vegetal, bajo el control de las señales de expresión vegetal apropiadas, por ejemplo, un promotor específico de tejido, tal como un promotor específico de semilla. El vector de expresión que contiene el gen que codifica el polipéptido se puede transformar posteriormente en células vegetales, y se pueden seleccionar células transformadas para la regeneración en todas las plantas. Las plantas transgénicas así obtenidas se pueden hacer crecer y cosechar, y aquellas partes de las plantas que contienen el polipéptido heterólogo (a la planta) se puede incluir en una de las composiciones, como tal o para procesamiento adicional posterior. Los métodos generales para la expresión de enzimas (heterólogas) en plantas (transgénicas), que incluyen métodos para expresión específica de semilla de enzimas, se conocen²³. El polipéptido heterólogo puede estar contenido en la semilla de las plantas transgénicas o éste puede estar contenido en otras partes de planta tales como raíces, tallos, hojas, madera, flores, corteza y/o fruto. La planta puede ser un monocotiledón o un dicotiledón. Las plantas adecuadas incluyen cereales, tales como avena, cebada, trigo, maíz y arroz. Preferiblemente el polinucleótido de la invención está establemente incorporado en el genoma de la planta.

La adición del polipéptido en la forma de un material vegetal trasgénico, por ejemplo, en semilla transgénica puede requerir el procesamiento del material vegetal con el fin de hacer la enzima disponible, o por lo menos mejorar su disponibilidad. Tales técnicas de procesamiento pueden incluir técnicas mecánicas (por ejemplo, molido y/o macerado) o tratamientos termomecánicos tales como la extrusión o la expansión.

ES 2 299 486 T3

La presente invención se relaciona así con procesos para promover el crecimiento y/o la conversión de alimento en un animal mono-gástrico o no rumiantes, el proceso comprende alimentar el polipéptido animal de la invención. Los animales adecuados incluyen animales de granja, mono-gástricos y/o no rumiantes tales como cerdos (o lechones), aves de corral (tales como pollos, pavos), terneros o terneras o animales acuáticos (por ejemplo, marinos) (por ejemplo, peces).

Ensayos para Enzimas que Degradan Celulosa

También dentro de la presente invención está el uso de polipéptidos de acuerdo con la invención para seleccionar métodos para identificar compuestos que pueden actuar como agonistas o antagonistas que puedan modular la β -glucanasa. En términos generales, tales métodos de selección pueden involucrar poner en contacto un polipéptido de la invención con un compuesto de prueba y luego medir la actividad o incubar el polipéptido de la invención con una sustancia de prueba y luego detectar cualquier modulación de la actividad de β -glucanasa. Los agentes que se pueden unir a los polipéptidos de la presente invención también se pueden identificar mediante ensayos de unión.

La actividad moduladora se puede determinar al poner en contacto las células que expresan un polipéptido de la invención con una sustancia bajo investigación y al monitorear el efecto mediado por los polipéptidos. Las células que expresan el polipéptido pueden ser *in vitro* y preferiblemente, el ensayo se lleva a cabo utilizando células que expresan polipéptido recombinante.

Los ensayos y los sustratos descritos aquí han permitido la identificación y la confirmación de la actividad de β -glucanasa. Sin embargo, estos ensayos se pueden utilizar para detectar otras enzimas que degradan celulosa, sean o no que ellas tengan actividad de β -glucanasa. El sustrato que se puede utilizar para este ensayo puede comprender β -glucano.

Otro aspecto de la invención se relaciona con un ensayo para identificar o detectar un polipéptido que es capaz de degradar celulosa. La actividad puede ser una glucanasa (por ejemplo, β -glucanasa) o celulosa o xiloglucanasa. El ensayo puede comprender:

(a) suministrar, como sustrato para un compuesto candidato (usualmente un polipéptido) el sustrato descrito en el párrafo previo; y

(b) poner en contacto el sustrato con un compuesto candidato, y detectar si se produce cualquier carbohidrato.

La cantidad de estos carbohidratos se pueden medir, si es necesario, ellos se pueden comparar con la cantidad de los carbohidratos producidos en un experimento de control, en ausencia del compuesto candidato.

Los ensayos anteriores se pueden emplear para identificar los moduladores de la actividad β -glucanasa.

Las características preferidas y las características de un aspecto de la invención son aplicables a otro aspecto *mutatis mutandis*.

La invención será ahora descrita con referencia a los siguientes Ejemplos que pretenden ser ilustrativos solamente y no limitantes.

Ejemplos

Procedimientos generales

Las técnicas de clonación molecular estándar tales como el aislamiento de ADN, la electroforesis de gel, las modificaciones de restricción enzimática de los ácidos nucleicos, el análisis Southern, la transformación de *E. coli*, los levantamientos de colonia y la hibridación de filtro, etc., se desarrollaron utilizando técnicas estándar^{1,2}. Los oligonucleótidos sintéticos se obtuvieron de ISOGEN Bioscience (Maarssen, The Netherlands). Los análisis de secuencia de ADN se desarrollaron sobre un secuenciador de ADN de Applied Biosystems 373A, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La marcación y la hibridación del ADN se condujeron de acuerdo a la marcación de ácido nucleico directa ECLTM y a los sistemas de detección (Amersham LIFE SCIENCE, Little Chalfont, Inglaterra) o de acuerdo a las técnicas de marcación radioactiva estándar¹.

Ejemplo 1

*Aislamiento de ARN proveniente de *T. emersonii* y síntesis de cADN*

La cepa de *T. emersonii* CBS 393,64 se fermentó bajo condiciones inductoras de celulosa. En varios puntos de tiempo los sobrenadantes del micelio y cultivo se cosecharon mediante filtración utilizando un envoltorio de filtración Miracloth. El micelio se lavó extensivamente con agua desmineralizada y se exprimó entre toallas de papel para remover el exceso de agua. El micelio de puntos de tiempo seleccionados (con base en las mediciones de celulosa en

ES 2 299 486 T3

los sobrenadantes de cultivo) se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se molió hasta un polvo fino utilizando un mortero y macerador. El polvo resultante se transfirió a un tubo estéril de 50 ml y se pesó: para cada 1-1,2 g del micelio molido 10 ml del reactivo TRIzol (Gibco/BRL) se agregó (máximo a 25 ml por tubo). El polvo micelial se solubilizó inmediatamente mediante mezclado riguroso (vorticiando, 1 min), seguido de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente con mezclado ocasional. Un volumen de cloroformo 0,2 (TRIzol original) (así 2 ml por cada 10 ml de TRIzol utilizados originalmente) se agregaron, vorticiados y dejados a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 4°C, 6.000 g durante 30 minutos. La fase acuosa superior se transformó a un tubo fresco y se precipitó ARN total mediante la adición de un volumen 0, (TRIzol original) de 5 isopropil alcohol (así 5 ml de isopropil alcohol para cada 10 ml de TRIzol originalmente utilizados). Después de 10 minutos de precipitación a temperatura ambiente, el ARN se recuperó mediante centrifugación durante 30 minutos a 6.000 g. A la remoción del sobrenadante el pelmazo de ARN se enjuagó con un volumen de 70% de etanol. Después de la remoción del etanol, el pelmazo de ARN se secó al aire. El pelmazo de ARN seco se disolvió en 3 ml de amortiguador GTS (100 mM Tris-Cl, pH 7,5, guanidinio tiocianato 4 M, 0,5% de lauril sarcosinato de sodio). Se utilizó 10 μ l de solución de ARN para determinar la calidad y la concentración de los ácidos nucleicos.

Se desarrolló análisis Northern³ y se purificó adicionalmente ARN aislado^{1,3}. Para el aislamiento de mRNA se utilizó un protocolo modificado (utilizando flujo de gravedad en lugar de centrifugación) del kit de purificación PHARMACIA (Cat no. 27-9258-02)³. Para la síntesis de cADN se utilizó un KIT de Síntesis de cADN STRATAGENE de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto para el número de optimizaciones para utilizar los vectores pGBFIN con mayores cambios como se describió previamente³.

La cantidad de cADN sintetizado se estimó mediante la precipitación de TCA y subsecuentemente se analizó por vía de electroforesis en geles de azarosa alcalina³.

Ejemplo 2

Preparación de colección de cADN de mRNA de T. emersonii

El grupo de cADN obtenido en el Ejemplo 1 fue despuntado, ligado con adaptadores y digerido con enzimas de restricción³.

La clonación de cADN en el vector de expresión pGBFIN-11 (ver WO-99/32617 para la construcción de este vector) requiere la presencia de un sitio EcoRI en el extremo 5' de un sitio XhoI sobre el extremo 3' del cADN. Por lo tanto el primer oligonucleótido cebador de cadena y las secuencias adaptadoras utilizadas (Pharmacia) se escogieron para cumplir con los prerequisites establecidos para el vector de expresión.

Los cADN obtenidos se separaron por vía de fraccionamiento de tamaño a través de una matriz de SEPHAROSE CL-2B, luego de lo cual el tamaño de los grupos individuales obtenidos se analizaron por medio de electroforesis de gel no desnaturalizante³. Dos grupos de cADN, obtenidos por vía "cut offs" a 0,5 kb y 1,0 kb respectivamente, se seleccionaron para la construcción de la colección de cADN en el pGBFIN-11. Para el pGBFIN-11, se preparó un grupo de un vector pGBFIN-11 completamente digerido doble (EcoRI-XhoI) (ligación de trasfondo <1%). Los grupos de cADN seleccionados, se ligaron en el vector pGBFIN-11 y transformados en células bacterianas de *E. coli* y XL 10-Gold para generar dos colecciones de cADN primario. Las frecuencias de transformación de los dos grupos fueron ambas >1,0 por 10⁶. De la fracción de ambos las colecciones de cADN de *E. coli*, se seleccionaron colonias aleatoriamente y se aisló el plásmido de ADN. Los análisis de este plásmido de ADN demostraron que ambas colecciones de cADN tuvieron porcentajes de inserto entre 90 y 95%.

Adicionalmente, los levantamientos de colonia se desarrollaron de una fracción de la colección y los filtros generados se hibridaron posteriormente con el gen *gpdA* de *T. emersonii*, que codifica un gen de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Luego, el plásmido de ADN se aisló por vía del análisis de restricción éste demostró que todo el plásmido contenía insertos simples en la orientación correcta. Secuenciando los extremos 5' del cADN con estos plásmidos que contienen *gpdA* de *T. emersonii* se demostró que > 85% era de longitud completa.

Ejemplo 3

Transformación de la colección de expresión a A. niger

El ADN se aisló de la colección de cADN de *E. coli* como se describió anteriormente. El ADN del plásmido se digirió durante 4 horas a 37°C con un NotI para remover las secuencias de plásmido derivadas de *E. coli*. Después de la purificación, el ADN se disolvió en agua desmineralizada estéril.

Múltiples transformaciones de DS2978 de *A. niger* se desarrollaron³ utilizando 1,5 x 10⁷ B 3,0 x 10⁷ protoplastos y 10 μ g del ADN de plásmido por transformación. Los transformantes se seleccionaron para la presencia del marcador de selección *amdS* mediante crecimiento sobre acetamida como una sola fuente N. En razón a que ambos marcadores de selección *amdS* y el casete de expresión de cADN están presentes en el fragmento de integrina crecido sobre acetamida es indicativo para la presencia del casete de expresión de cADN.

ES 2 299 486 T3

Después de aproximadamente 7-10 días de incubación a 30°C, se purificaron 10.000 transformantes: los transformantes de *Aspergillus niger* se transfirieron robóticamente (FlexysJcolony picker automater) de las placas de transformación hacia Placas MTP Master de 96 pozos (MP) que contienen 150 µl por pozo de medio selectivo solidificado (SM) (por 1.000 ml: 0,52 g de KCl, 1,52 g de K₂ HPO₄, 0,52 g de MgSO₄, 20 g de glucosa, 1 g de acetamida, 0,1M amortiguador MES, 15 g de agar, 1 ml de solución de elemento en traza [solución de elementos en traza (que contienen por 1 litro): 2,2 g de ZnSO₄/7 H₂O, 1,1 g de H₃BO₃, 0,5 g FeSO₄/7H₂O, 0,17 g de CoCl₂/6H₂O, 0,16 g de CuSO₄/5H₂O, 0,15 g de NaMoO₄/2H₂O, 5,0 g de EDTA, pH 6,5] pH 5,5. Los transformantes fueron crecidos sobre SM durante 5 días a 34°C. El grupo así generado de MP se utilizó para 1) incocular los MTP para crecimiento y subsecuente detección de enzima y 2) placas de respaldo (BP) de la colección de cADN que se almacenó a -80°C.

10

Ejemplo 4

Análisis de la colección de expresión de T. emersonii

15

Los MP crecidos con 5 días de edad se utilizaron como molde de replicación y las replicas fueron puestas en placas sobre placas de medio selectivo fresco (SM, que contienen por litro: 0,52 g de KCl, 1,52 g de K₂HPO₄, 0,52 g de MgSO₄, 20 g de glucosa, 1 g de acetamida, 0,1 M de amortiguador MES, 15 g de agar, 1 ml de solución de elemento de traza [solución de elementos de traza (por 1 litro): 2,2 g de ZnSO₄/7 H₂O, 1,1 g de H₃BO₃, 0,5 g FeSO₄/7H₂O, 0,17 g de CoCl₂/6H₂O, 0,16 g de CuSO₄/5H₂O, 0,15 g de NaMoO₄/2H₂O, 5,0 g de EDTA, pH 6,5] pH 5,5.

20

Una vez inoculadas las placas se incubaron a 34°C durante 48 h. Posteriormente las placas se llenaron con carboximetilcelulosa que contiene agar en la parte superior (CMC) (5 g de agarosa, 0,5 g de CMC (Sigma ref C4888) preparada en 1.000 ml de 50 mM de amortiguador de fosfato pH 7). Una vez que el agar superior se solidificó, las placas se elevaron a 65°C durante 4 horas. Para la visualización de la actividad, las placas se tiñeron con solución de rojo Congo (10 g de rojo Congo en 1.000 ml de amortiguador de fosfato pH7) durante 15 minutos. La solución teñida se descartó y las placas se lavaron con 1M de NaCl (58,44 g en 1 litro de agua destilada). Esta etapa final se repitió dos veces. Los clones positivos aparecieron al formar un halo claro pálido sobre un piso rojo negro.

25

Los clones de celulasa positivos de esta primera selección (que demuestran un halo claro después de la selección con rojo congo) se inocularon de nuevo sobre un medio SM fresco y se hicieron crecer durante 5 días a 34°C. La placa de molde así obtenida se replicó entonces sobre un medio selectivo y sobre un medio selectivo que contiene 0,075% (p/v) de AZCL-celulosa (catálogo de Megazime ref. I-AZCEL). Las placas SM se trataron y se calificaron como se describió previamente (crecidas a 34°C y posterior selección por vía de un sobrepuesto que contiene celulosa y un teñido con rojo Congo) mientras que las placas con SM-AZCEL-celulosa se incubaron a 34°C durante 48 h y luego se incubaron adicionalmente a 65°C durante 8 h. Las placas con SM-AZCL-celulosa se calificaron antes y después de la incubación a alta temperatura. Los clones con celulasa positiva dieron como resultado un halo azul difuso.

30

Finalmente, se identificaron 20 clones de celulasa positivos. La celulasa que produce los transformantes de *Aspergillus*, como se identificó en el ensayo de placa de xilanasa, crecieron en la fermentación de frasco agitado³. Las muestras de medio se tomaron después de 5 días de fermentación y se analizaron para actividad de celulasa como se describió posteriormente.

35

Ejemplo 5

Análisis genético de Transformantes positivos

Los transformantes positivos (re-confirmados) identificados crecieron en medio líquido, el micelio se cosechó y se aisló el ADN total (cromosómico) utilizando el Sistema de Aislamiento Puregene (Biozym B.V.) para el aislamiento de ADN proveniente de hongos filamentosos. El aislamiento y la purificación de ADN se desarrollaron de acuerdo al protocolo del fabricante, pero ligeramente modificado: las etapas de precipitación de proteína 3 y 4 se repitieron.

40

El ADN cromosómico se utilizó como una plantilla en una reacción PCR que utiliza los cebadores 12207 (SEQ ID No. 8) y 11937 (SEQ ID No. 7) para amplificar el o los insertos presentes en el casete de expresión integrado en el ADN cromosómico.

45

Los PCR directos sobre los transformantes se desarrollaron de acuerdo a una versión adaptada de un protocolo⁴ conocido donde el micelio obtenido se trató subsecuentemente con GlucanexJ (Novo Nordisk) a concentraciones de 5 mg/ml en lugar del NOVOzyme.

50

Las reacciones de PCR contenidas en el amortiguador eLONGase™ B (Life Technologies, Breda, The Netherlands), los dNTP (200 µM de cada uno), 1 µl de la Mezcla de Enzima eLONGase™, una plantilla de 1-5 µl, y 10-30 pmol de cada oligo, en un volumen final de 50 µl. La cantidad óptima de oligo se determinó experimentalmente para cada tanda comprada. En promedio, se utilizaron 10 a 30 pmol. Las reacciones se desarrollaron con las siguientes condiciones de ciclo: 1 x (2 min)94°C, 35 x (1 min 94°C, 1 min 55°C, 6 min 72°C), 1 x (7 min 72°C). Las muestras se cargaron sobre geles de agarosa para análisis de los productos PCR.

55

60

65

ES 2 299 486 T3

El producto PCR así obtenido se subclonó en un vector de clonación *E. coli* pcr2,1 (Invitrogen, de acuerdo a las instrucciones del fabricante), dando como resultado un plásmido pGBCEA-1.

El producto PCR subclonado se secuenció. La secuencia de nucleótido resultante de la región codificante se describió en la SEQ ID NO 1 y la secuencia de aminoácido deducida de la proteína en la SEQ ID NO 2. Esta proteína había sido denominada CEA.

Ejemplo 6

Selección viscométrica de la Colección de Expresión de cADN utilizando el Viscorobot Hamilton

Mediciones Viscométricas

Los viscosímetros capilares son los tipos más comúnmente utilizados de viscosímetros utilizados para las mediciones de líquidos viscosos. En general, el líquido de interés se hace para fluir a través de un tubo capilar bajo unas diferencias de presión conocidas. Luego la tasa de flujo se mide, usualmente al notar el tiempo tomado para un volumen dado de líquido para pasar una marca de graduación. Otros tipos de viscosímetros capilares fuerzan el líquido a través de un capilar a una tasa predeterminada de flujo, y la caída de la presión producida de esta manera a través del capilar se mide con el fin de determinar la viscosidad de líquidos. La degradación enzimática controlada de las soluciones viscosas poliméricas se puede utilizar para determinar la actividad de la enzima. Suministrando las relaciones numéricas entre la viscosidad y la concentración del líquido es conocido, que se pueden estimar los parámetros cinéticos tales como la constante de Michaelis-Menten.

I. El Sistema de Detección

(a) La configuración del viscorobot Hamilton

El robot de pipeteo Hamilton (Hamilton Workstation Microlab 2200, Hamilton Company, Reno, USA) se controló mediante un programa de software denominado Eclipse (Hamilton Company). Este software le posibilita al usuario dirigir la sonda-brazo a cierta posición dentro del espacio de trabajo del Hamilton. Se desarrolló un programa Eclipse de visco-ensayo estándar. Este programa trabaja sobre los MTP de 96 pozos, donde cada pozo se manejó individualmente. Las jeringas se utilizan para aspirar o dispensar líquido de muestra en una posición específica Eclipse a través del orificio de la aguja. Tanto la aspiración como la velocidad de dispersión (en seg/ml) así como también la aspiración y la dispersión de los volúmenes (en μl) se especificaron según se deseara. Al implementar las definiciones de bastidor, los recipientes de múltiples reactivos se pueden abordar de una manera eficiente y a la hora de tiempo. Para el transporte sobre el líquido de la muestra de una etapa de pipeteo a la siguiente se evitó por instrucciones de Eclipse enjuagar el tubo con un fluido del sistema. La velocidad de aspiración de 10 seg/ml (algunas veces 15 seg/ml) fue adecuada para distinguir la mayoría de las viscosidades al mirar en las alturas pico. Usualmente 200 - 250 μl del líquido de muestra se aspiraron y dispensaron.

(b) Configuración del Hamilton

La aspiración del líquido de muestra produce una caída de presión a través de la tubería llenada con agua. La magnitud de la caída de la presión depende tanto de la velocidad de aspiración (o movimiento del émbolo) como sobre la viscosidad del líquido de muestra. La caída de presión más alta se crea en la punta de la aguja, en razón a que el radio es más pequeño (aproximadamente 0,3 mm). La aspiración del líquido de muestra origina cambios en la presión, que son relevados de la unión del transductor de presión T. El transductor (Dépex B.V., de Bilt, Holanda) convierte la magnitud de la infrapresión en una corriente eléctrica. La corriente eléctrica es leída por un Datataker una vez por segundo, y posteriormente almacenada en la memoria del Datataker en un formato digital. Una computadora que es conectada al Datataker posibilita (por vía del software Delogger) la bajada de la memoria del Datataker en archivos. Ellos a su vez pueden ser leídos y analizados por programas de hojas de cálculo comunes (tales como Microsoft Excel). En razón a que la presión se midió con el tiempo, la salida final se puede visualizar al graficar la magnitud de la infrapresión (en mV) contra el tiempo (en segundos). Luego del desplazamiento de la unión T a una posición derecha detrás de la aguja, la señal de presión es menos dependiente del volumen de la aspiración.

(c) Preparación de curvas de calibración permitidas para la determinación de la viscosidad de cualquier líquido

De acuerdo con la Ley de Poiseuille, la caída de presión medida debe ser directamente proporcional a la viscosidad, en razón de que

$$P=(mV)F \frac{Q8\eta l}{\pi r^4} = \eta \frac{l}{k} \quad \text{donde} \quad k = \frac{\pi r^4}{8lQ}$$

ES 2 299 486 T3

Con esta fórmula es posible relacionar la salida de infrapresión mili-Volt a la viscosidad desconocida del líquido de muestra. Esto se hizo al aspirar un volumen constante definido de líquido de calibración (usualmente glicerol, en la medida en que éste cubra un amplio rango de viscosidades y se comporte de una manera Newtoniana) en varias concentraciones. La infrapresión así creada relaciona la salida mV por un factor desconocido F. En razón a que las viscosidades absolutas de varias concentraciones de glicerol son conocidas, la gráfica de la salida de infrapresión mV para varias concentraciones de glicerol contra las viscosidades absolutas conocidas de las mismas concentraciones de glicerol producen una línea recta a través del origen (en razón a que $P = (mV) * F = \eta/k$).

(d) Programa de Eclipse utilizado para la Selección a Escala Completa

Un ciclo de medición único consiste de la aspiración de la muestra de 250 μ l y la mezcla de sustrato sobrenadante) a una velocidad de aspiración de 10 seg/ml. Antes de la aspiración del fluido de muestra, se aspiró 40 μ l de aire para separar el sistema del fluido de muestra. Una vez que la aspiración del líquido de muestra se completa, ésta es seguida por la dispersión de 290 μ l de la muestra y aire. Este ciclo de medición se repitió seis veces, y se siguió por una etapa de lavado de 5 ml con el fin de limpiar la tubería.

II. Desarrollo de Ensayo

(e) Establecer la mezcla de sustrato óptima de pectina y xilano para selección

Utilizando más de un sustrato viscoso a la vez tiene varias ventajas. Uno puede seleccionar diferentes tipos de enzimas a la vez. Esto ahorra una gran cantidad de esfuerzo y tiempo aunque se requiere menos sustrato. Además del xilano "spelt" de avena se decidió utilizar pectina como el segundo sustrato. Una solución 1:1 de pectina al 1% y 7% de xilano cascarilla de avena parece ser el más adecuado para seleccionar. En razón a que hubo proporcionalmente menos clones positivos en la colección, la mayoría de los picos tuvo una altura aproximada de 435 mV. En el caso de la muestra de xilanasa positiva, todo o la mayoría del xilano se puede degradar de tal forma que solamente 0,5% de la pectina se deja. De esta manera, el clon de xilanasa positivo produjo una altura pico de 280 mV. En el caso del clon de la pectina que degrada, la altura del pico fue de 220 mV.

(f) Determinación de la actividad de xilanasa mínima necesaria para detectar con el viscorobot Hamilton

La selección se llevó a cabo con muy pequeños volúmenes de tanto el sustrato como el sobrenadante, en razón a que un pozo MTP único mantiene como máximo 360 μ l. Además, entre más sobrenadante se agregue, más sustrato se diluye, y más viscosidad inicial se reduce. 250 μ l de 6% de xilano cascarilla de avena se suministró en los pozos de un MTP. La disolución de una serie de una xilanasa de referencia (xilanasa de *A. tubigensis* con una actividad de 685.400 EXU/g, donde

1 EXU = 4,53 moles de azúcares reductores/min/g) se prepararon y 30 μ l de cada disolución se agregó al sustrato. Después de la incubación durante 24 horas a 50°C, la viscosidad de cada muestra se midió. La concentración de enzima detectable más baja se corresponde con 53,6 ng/ml o 0,0367 EXU/ml. De esta manera, la adición de 20 μ l de sobrenadante a 300 μ l de sustrato posibilitará la detección de actividades de enzima extremadamente bajas.

(g) Configurar la selección para la identificación de enzimas termoestables

Con el fin de recoger solamente las enzimas termoestables de la colección y con el fin de evitar la interferencia de la actividad de las enzimas de *A. niger* huésped, las placas con los clones que contienen las enzimas candidato termoestables se sometieron a tratamiento con calor. El sistema fue validado utilizando cepas huésped vacías, las cepas huésped que expresan enzimas termo-lábiles y cepas huéspedes que expresan enzimas termoestables. Después del crecimiento de las cepas y la producción de la enzima las placas MTP se calentaron a 72°C durante 30 minutos. Posteriormente 20 μ l de sobrenadante se agregaron a 300 μ l de 6% de xilano cascarilla de avena. Junto con los controles negativos (adición de 20 μ l de agua), las placas que contienen las muestras se sellaron con una tapa pegada e incubada a 60°C en el horno. La temperatura alta puede incrementar cualquier actividad de enzima termoestable pero destruye tanto la enzima de *A. niger* huésped de trasfondo que interfiere la actividad y las actividades de enzima no termoestable expresadas por la colección. Después de 20 horas de incubación, ninguna disminución notable en el pico alto se encontró para los clones de xilanasa termo-lábiles, indicando que la actividad de la xilanasa huésped se había inactivado completamente. Además los clones de la enzima de xilanasa termolábil xynB de *Aspergillus niger* se incluyeron como un control. En este caso ninguna actividad residual podría ser detectada, aunque de otra parte la xilanasa resistente al calor que se incluyó como control estaba aún activa. la inactivación del calor durante 30 minutos a 72°C y los tiempos de incubación de la muestra de 24 horas o menos los posibilitaron a detectar específicamente las xilanasas termoestables de *T. emersonii*.

III Selección de la colección de expresión de cADN utilizando el Visco-robot Hamilton

(h) Replicación de la colección de expresión de cADN y la expresión de la colección

Un ciclo de replicación involucra la inoculación de dos veces del medio selectivo (SM) (que contienen por litro: 0,52 g de KCl, 1,52 g de K₂HPO₄, 0,52 g de MgSO₄, 20 g de glucosa, 1 g de acetamida, 0,1 M de amortiguador MES, 15 g de agar, 1 ml de solución de elemento traza [solución de elementos traza (por 1 litro): 2,2 g de ZnSO₄/7 H₂O,

ES 2 299 486 T3

1,1 g de H_3BO_3 , 0,5 g $FeSO_4/7H_2O$, 0,17 g de $CoCl_2/6H_2O$, 0,16 g de $CuSO_4/5H_2O$, 0,15 g de $NaMoO_4/2H_2O$, 5,0 g de EDTA, pH 6,5] pH 5,5) y el medio de crecimiento líquido (GM) (que contiene, por litro, 70 g de glucosa, 25 g de hidrolizado de caseína, 12,5 g de extracto de levadura, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de K_2SO_4 , 2 g de $MgSO_4$, 0,03 g de $ZnCl_2$, 0,02 g de $CaCl_2$, 0,01 $MnSO_4$, 0,3 g de $FeSO_4$, pH 5,6). La colección se almacenó en los MTP estándar, donde las colonias de *A. niger* recombinantes esporuladas crecieron en cada pozo sobre SM en la presencia de 10% de glicol. Durante el almacenamiento, estas placas (placas maestras, las MP) se mantuvieron en un estado congelado (-80°C). Antes de la replicación de las MP, ellas se descongelaron durante una hora en un armario de humo esterilizado para evitar la contaminación microbiana. La replicación de las MP se desarrolló con un Replicador PBA Flexys-Colony. Las Placas Maestras con crecimiento de 5 días se utilizaron como molde de replicación y la réplica se puso en placas en los MTP de 96 pozos llenados con medio de crecimiento líquido (GM). Las placas de agar SM recientemente inoculadas se colocaron en una incubadora a 32°C y posteriormente se almacenaron a -80°C después de la adición de 150 μ l de 10% de glicerol por pozo. Las placas de producción GM se incubaron en un Agitador Tomtec Quadrastor de agua saturada 96000 (32°C). Las placas mostraron micelio en crecimiento después de 2-3 días. Las placas GM se incubaron durante 6 días.

(i) Muestra de los sobrenadantes después de que se completa el crecimiento

Después de 6 días de crecimiento, el medio de crecimiento líquido GM restante (que contiene productos de expresión extracelular) se extrajo y se transfirió con los MTP frescos. Los sobrenadantes se transfirieron en los MTP frescos utilizando un robot de pipeteo Tecan de 4 canales. El volumen promedio del sobrenadante recuperado estuvo entre 120 y 140 μ l. Estas placas sobrenadantes se congelaron y se ensayaron posteriormente para actividad de xilanas.

(j) Preparaciones de la selección con escala completa

Las placas sobrenadantes de la colección de expresión se descongelaron y se colocaron en un baño de agua cerrada a 72°C durante 35-40 minutos. Utilizando una pipeta de 12 canales y las puntas de pipeta pre-preparadas comerciales en bastidores con formato MTP desechable (suministradas por Eppendorf), 20 μ l de cada sobrenadante se transfirió a la mezcla de sustrato que contiene MTP que se había calentado a 60°C antes de agregar los sobrenadantes. La mezcla del sustrato consistió de una mezcla 1:1 de 1% de pectina (ver (k) adelante) y 7% de xilano cascarilla de avena (ver (l) adelante), con un pH final de 4,12. Los MTP de ensayo se llenaron con 310 ml de sustrato/pozo. La mezcla de los sobrenadantes con la mezcla del sustrato se logró al agitar las puntas de la pipeta en los pozos de muestra directamente después de suministrar los sobrenadantes. Posteriormente las placas se colocaron en un horno a 60°C durante un período de incubación de 18-24 horas. Después de la incubación, a los MTP se les permitió enfriarse y se seleccionaron para una disminución de viscosidad utilizando el visco-robot Hamilton (Hamilton Company, Reno, USA).

(k) Preparación de 1% de pectina, pH 4,1

Un amortiguador de fosfato de ácido cítrico (amortiguador Mc Ilvaine) se preparó al agregar una solución de 0,2M de $NaHPO_4$ a 250 ml de la solución de ácido cítrico 0,1M hasta que se obtuvo un pH de 5,5. Esto se hizo hasta un litro con agua destilada, y el pH se reajustó si era necesario. Una solución de pectina de 0,5% se hizo al agregar lentamente 0,5 g de pectina altamente metilada (tipo Ruban Brun) a un recipiente que contiene 50 ml del amortiguador McIlvaine anterior y 25 ml de agua destilada a 60°C. La agitación vigorosa aseguró que la pectina se disolviera bien. Esto se hizo hasta 100 ml, y el pH se revisó de nuevo. La pectina utilizada aquí bajó el pH de la solución, de tal forma que bajo estas condiciones la solución tuvo un pH de 5,1. Si la solución de pectina era turbia, fue útil centrifugar la solución a 15 g durante 15 minutos con el fin de remover cualquier partícula no disuelta.

(l) Preparación de un xilano cascarilla de avena tratado con alcalino al 7%, pH 4,4

Se calentaron 20 ml de NaOH 2M hasta 60°C en un beaker de 150 ml. En un beaker separado 7 g de xilano cascarilla de avena (de Sigma Company) se agregaron a 20 ml de agua, de tal forma que se formó una masa café brillante. Si es necesario, se agrega más agua, pero no más de 30 ml en total. Utilizando una cuchara de acero, esta masa de xilano cascarilla de avena en agua se agregó lentamente a la solución de hidróxido, manteniendo de esta manera la temperatura a un constante de 60°C. Una vez que todo el xilano se disolvió, la solución se volvió café oscura y se semejó a un jarabe claro muy viscoso. Entonces el resto del agua se agregó de tal forma que la cantidad total de 50 ml se hubiera agregado. A la solución se le permitió enfriarse y se agregó HCl 4N hasta que se logró el pH deseado (usualmente un pH 4,1-4,2). La solución se completó hasta 100 ml y el pH se reajustó si era necesario. La centrifugación de 20.000 g durante 15 minutos a 10°C produjo un sobrenadante amarillo claro (cuya viscosidad dependió de la cantidad inicial de xilano cascarilla de avena agregado).

(m) La selección de la colección

El resultado de la selección de la colección de *Talaromices emersonii* clonada en *A. niger* fue de 119 gráficos que corresponden con los 119 MTP probados. Cada gráfico mostró la viscosidad de 96 pozos representados como 96 picos los cuales midieron la infrapresión por pozo en mV. Las gráficas se analizaron para los picos bajos, lo que indicó viscosidad reducida. Los picos que eran inferiores a la altura de pico promedio se seleccionaron para reensayo. Algunas placas produjeron muy poca variación, de tal forma que la selección de los clones positivos putativos para

ES 2 299 486 T3

reensayo fue fácil. Otras placas mostraron una gran cantidad de variación, de esta manera a menudo más de 5 o 6 clones putativos se seleccionaron para reensayo. Para tener un control positivo, después de la incubación de 10 μ l de una endoxilanas se agregó una placa aleatoria a una posición fija. De aquellos controles positivos, se encontró que si

5 Las placas de la colección de *Talaromices* que se probaron también contenían cinco clones de xilanas termoestable confirmados que se encontraron antes de utilizar el ensayo de detección de tinte con base en la solubilización de los tintes que fueron químicamente unidos al sustrato polimérico insoluble. Sin excepción, aquellos cinco clones fueron independientemente encontrados con el ensayo de viscometría ya en la ronda de selección primaria. Todos los picos

(n) Reensayo de 118 clones putativos

15 El reensayo se basó en el ensayo de viscometría de acuerdo con el principio utilizado con la selección a escala completa. Esta vez, sin embargo, se utilizó un mayor volumen de ensayo, en razón a que se podía hacer una distinción clara entre la actividad de enzima termoestable y los picos bajos irregulares. Dos MTP grandes (2 ml/pozo) se llenaron con 1,2 ml de 9% de xilano cascarilla de avena. A los primeros dos pozos de cada hilera se les agregó 50 μ l de agua (control negativo). Al último pozo de cada hilera, se le agregó 50 μ l de una solución de endoxilanas de referencia

20 con el fin de tener un control positivo, también. Los pozos 3 a 11 de cada hilera se utilizaron para reensayar los clones de xilanas putativos (adición de 50 μ l de sobrenadante). Después de mezclar e incubar durante 24 horas a 60°C, las viscosidades se midieron con un programa Eclipse específicamente diseñado (Volumen de aspiración: 800 μ l, Velocidad de aspiración: 10 seg/ml).

25 Varios clones positivos se identificaron en razón a que sus picos estuvieron exactamente sobre el mismo nivel de los controles positivos, indicando la degradación completa del xilano. En total trece cepas putativas se identificaron en el reensayo de viscoelección. Los insertos de cADN se clonaron directamente en el vector pCR2.1 por vía de amplificación PCR ejecutada sobre ADN cromosómico. De las cepas de 12 colecciones se obtuvieron dieciséis insertos de cADN, utilizando dos polimerasas y un grupo de cebador 2 (11397/12207, SEQ ID Nos. 7 y 8). La orientación del inserto de cADN en el vector pCR2.1 se determinó mediante digestión de XhoI, que estuvo localizada en el vector y en el 3' del cADN. El análisis de la secuencia de ADN se ejecutó sobre el extremo 5' de los insertos de cADN.

30 El reensayo para posibles enzimas que degradan pectina se desarrolló de una manera similar que para la xilanas, excepto que se utilizó el 1% de pectina en lugar del 9% de xilano cascarilla de avena. Solamente diez clones posibles se reensayaron, que fueron aquellos que produjeron picos muy bajos en la ronda de selección primaria pero no mostraron ninguna actividad durante el reensayo de xilanas. De manera reproducible un clon produjo una enzima que degrada pectina. El valor de la presión medida de 200 mV corresponde a la viscosidad del agua pura. En razón a que la pectina utilizada no fue completamente metilada, ésta podría haber sido degradada por una poligalacturonasa termoestable, pectato liasa o pectin liasa.

(o) Beneficios de la Viscoselección

El desarrollo de un método de selección viscométrico para identificar las enzimas termoestables se facilitó por tres factores clave. Primero, la posibilidad de la termo-activación de la actividad de xilanas huésped nativa permitió un desarrollo más rápido de las condiciones de reacción apropiadas. Segundo, el hecho de que los clones con enzimas termo-lábiles conocidas fueran prueban la termo-activación destruyó toda actividad de tal forma que solamente las enzimas más termoestables se recogieron. En tercer lugar las temperaturas elevadas incrementaron las actividades enzimáticas de tal forma que la selección se volvió aún más sensible. Sobre el Xilano cascarilla de avena (Sigma) se identificaron once clones que eran capaces de reducir la viscosidad significativamente y sobre la pectina se identificó un clon degradante de pectina definido. Adicionalmente, cinco clones de xilanas termoestable que se identificaron previamente fueron independientemente re-descubiertos.

Ejemplo 7

55 *Caracterización de la primera β -glucanasa termoestable de *Talaromices emersonii* (CEA) del transformante *A. Níger**

Ensayos de Actividad y definiciones

60 *Definición de la Unidad PAHBAH de Celulasa (CPU)*

Una unidad de actividad de celulasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un μ mol de azúcares reductores producidos por minuto a un pH de 5,0 y 60°C a una concentración de sustrato de 5% de Carboxi Metil Celulosa (CMC), utilizando una curva de calibración de glucosa.

65 La actividad de la enzima de acuerdo con el método CPU se midió al detectar azúcares reductores utilizando hidracida de ácido 4-hidroxi-benzoico (PAHBAH). El ensayo se basó en Lever, M., Powell, J.C., Killip, M., Small, C.W. (1973) J. Lab. Clin. Med. 82, 649-655 con algunas modificaciones. Las modificaciones es al reactivo PAHBAH

ES 2 299 486 T3

como sigue: 0,05 M de citrato de trisodio, 0,1 M de Na_2SO_3 , 0,02 M de CaCl_2 , 0,5M de NaOH y 0,1M de hidracida de ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH). El pH final fue 12. El reactivo que contiene PAHBAH en solución alcalina, almacenado a temperatura ambiente, se debe utilizar en un día. La glucosa se utilizó como azúcar reductor de referencia (curva de calibración). Para la curva de calibración de este ensayo, las concentraciones de glucosa final estuvieron entre 0-300 mM. La actividad CPU se ensayó al mezclar 100 μl de la solución de enzima con 400 μl de CMC al 5% en un amortiguador de acetato de sodio a 0,1 M (pH 5,0). Las copas Eppendorf con el sustrato (CMC) se preincubaron durante 5 minutos a 60°C. La reacción se inició al agregar la solución de enzima. Después de 15 minutos la reacción se detuvo al agregar 1,0 ml del reactivo PAHBAH. Las copas Eppendorf se calentaron durante 5 minutos a 100°C y luego enfriadas sobre hielo. Las muestras se centrifugaron a la velocidad apropiada con el fin de decantar cualquier material sólido (1 minuto a velocidad completa en una Beckman Microfuge E). La absorbancia se midió a 420 nm. Se preparó un blanco al agregar 100 μl de amortiguador de acetato de sodio 0,1M en lugar de la solución de enzima.

Definición de la Unidad de Beta Glucanasa (BGU)

La Unidad de Beta Glucanasa es la actividad requerida para liberar 0,258 μmol de azúcares reductores (medidos como equivalentes de glucosa) por minuto a pH 3,5 y 40°C, a una concentración de sustrato de 0,5% de β -glucano de cebada.

Así además de la determinación anterior de la actividad de celulasa (CPU), un ensayo más específico se llevó a cabo para detectar la actividad de β -glucanasa. El principio del ensayo es la velocidad en la cual la viscosidad disminuye de una solución de viscosidad media de β -glucan de cebada (Megazyme, Australia, 2/11 Ponderosa Parade, Warriewood NSW 2101) luego de la adición de una cierta cantidad de enzima. El β -glucan de cebada, viscosidad media (Megazyme, Australia), se disolvió en amortiguador de citrato de sodio 0,425M pH 3,5 a una concentración de 6,25 mg/ml. El sustrato se incubó a 40°C durante 10 minutos. Posteriormente una pequeña cantidad de enzima (en el rango de 0,005-0,062 Unidades/ml) se agregó y a la reacción se le permitió proceder. A 60 minutos de tiempo de reacción la viscosidad de la muestra se determinó con relación a la muestra de referencia que se incubó con una endo-glucanasa estándar de actividad enzimática conocida. Las actividades absolutas para el estándar se determinaron al reducir el método de azúcar utilizando Fe-III-hexacianuro y 4,76 mg/ml de β -glucan de cebada como concentración de sustrato inicial.

Definición de la Unidad de Endo Xilanasa (EXU)

La unidad de la actividad de xilanasa (EXU) se definió como la cantidad de enzima (endol endo-1,4- β -xilanasa de *Asp. niger*, como se describió en la EP-A-0,463,706 (Gist-brocades B.V.)) que libera 4,53 μmol de azúcares reductores (medidos como los equivalentes de xilosa) por minuto bajo condiciones de ensayo. Las condiciones de ensayo comprenden: 5 mg/ml de arabinoxilan proveniente de harina de trigo (Megazyme, Australia 2/11 Ponderosa Parade, Warriewood NSW 2101) en 100 mM de amortiguador de citrato de sodio (pH 3,5), temperatura 40°C, a un tiempo de reacción de 60 minutos. Las reacciones se detuvieron al agregar 1 M de NaOH. La detección se hizo colorimétricamente a 420 nm después de incubar las muestras con Fe-III-hexacianuro durante 15 minutos en agua hirviendo. El reactivo de hexacianoferrato se hizo al disolver 1,17 g de $\text{KFe}(\text{CN})_6$ y 19,5 g de carbonato de sodio anhidro en 1 litro de agua.

Además de la determinación absoluta anterior de la actividad de xilanasa, se utilizó un método relativo que siguió la disminución en la viscosidad de una solución con arabinoxilan de trigo (Megazyme, Australia 2/11 Ponderosa Parade, Warriewood NSW 2101) luego de la adición de cierta cantidad de enzima. El arabinoxilan de trigo se disolvió en 0,425M de amortiguador de citrato de sodio (pH 3,5) a una concentración de 8,3 mg/ml. El sustrato se incubó a 55°C durante 10 minutos. Posteriormente se agregó una pequeña cantidad de enzima (en el rango de 0,01-0,05 Unidades/ml) y a la reacción se le permitió proceder. Después de 60 minutos de tiempo de reacción la viscosidad de la muestra se determinó con relación a una referencia que se incubó con un estándar de endo-xilanasa de *Aspergillus niger* de actividad EXU conocida (EP-A-0,463,706). Las actividades absolutas en EXU para el estándar se determinaron por el método de azúcar reductor utilizando Fe-III-hexacianuro como se describió anteriormente. La viscosidad se determinó manualmente utilizando un aparato de viscosidad de nola de caída Haake.

Definición de la Unidad de Celulasa (CXU)

La unidad de la actividad de beta-glucanasa (BGU) se define como la cantidad de celulasa que hidroliza en una hora un número de enlaces glicosídicos equivalentes a la producción de 0,5 mg de glucosa bajo las condiciones de ensayo. Las condiciones de ensayo comprenden: 9 mg/ml de carboximetilcelulosa en 5 mM de amortiguador de acetato de sodio (pH=4,6), temperatura 37°C. La glucosa liberada se determinó mediante el método de azúcar reductor utilizando el reactivo DNS.

Además de la determinación absoluta anterior de la actividad celulasa, un método relativo se utilizó el cual siguió la disminución de la viscosidad de una solución de carboximetilcelulosa luego de la adición de una cierta cantidad de enzima. La carboximetilcelulosa se disolvió en un amortiguador de citrato de sodio 5 mM (pH=4.6) a una concentración que depende de la viscosidad de la tanda. El sustrato se incubó a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente una pequeña cantidad de enzima se agregó y a la reacción se le permitió proceder. Después de 60 minutos el tiempo de reacción de la viscosidad de la muestra se determinó con relación a una referencia que se incubó con un estándar de actividad CXU conocida.

Actividad de xrt pH

La β -glucanasa de *T. emersonii* se produjo mediante el o los transformantes de *A. niger* apropiados en recipientes de agitación como se describió en el Ejemplo 3 después de hacer crecer micelio el cual se removió mediante filtración. El filtrado se utilizó para este experimento. La actividad del filtrado se midió a valores diferentes de pH a una temperatura fija de 60°C. La actividad se midió de acuerdo al método CPU en lugar de utilizar el pH fijo del pH 5,0, el sustrato CMC se diluyó con un amortiguador de citrato del pH apropiado con el fin de obtener el pH de la medición. El experimento se repitió dos veces y los resultados se muestran en la Tabla 1 de adelante. El pH óptimo de la enzima se encontró que era entre pH 4,5 y 5,0, a aproximadamente pH 4,8.

TABLA 1
Perfil de pH a 60°C

pH	actividad (μ M de glucosa/15 minutos) a 60°C (mediciones duplicadas)	
3	27,2	27,7
3,5	66,6	64,2
4	109,3	102,6
4,5	133,8	120,6
5	121,3	135,5
5,5	116,4	107,4
6	68,7	69,3

Temperatura wrt de Actividad

La actividad de esta β -glucanasa se midió entonces a diferentes temperaturas. Las mediciones de actividad se llevaron a cabo de acuerdo al método CPU a un pH 4,0. En lugar de incubar a una temperatura fija de 60°C, las incubaciones se desarrollaron a varias temperaturas. El experimento se desarrolló dos veces y los resultados se muestran en la Tabla 2 de adelante. La temperatura óptima se encontró que era entre 80°C y 85°C. El T_{opt} parece ser de aproximadamente 84°C (aunque éste puede ser de 82°C, 83°C, u 85°C, dependiendo de cómo las líneas se dibujan y se interpolan entre los puntos de datos).

TABLA 2
Perfil de temperatura a pH 4

Temperatura (°C)	actividad (μ M glucosa/15 minutos): (mediciones de duplicado)	
60	87,8	102,1
70	156,4	154,6
80	208,5	213,1
90	185,4	176,4

Otras enzimas wrt Actividad

Además la actividad a 30-60°C se midió utilizando el método BGU para la β -glucanasa y se comparó con un caldo libre de célula de *T. reesei* comercialmente disponible que tiene actividad de celulasa y glucanasa como una referencia. El caldo libre de célula de *T. reesei* consistió de una mezcla de diferentes enzimas entre las cuales están una o más β -glucanasas pero donde estas actividades no se han caracterizado. Para comparar las actividades de β -glucanasa de *T. emersonii* de la invención y de las celulasas/glucanasas de *T. reesei*, las enzimas se dosificaron a aproximadamente actividad igual a 40°C. La actividad de β -glucanasa de *T. emersonii* a 40°C se estableció en una y así otras actividades con relación a esto. Los resultados se muestran adelante en la Tabla 3.

ES 2 299 486 T3

TABLA 3

Actividad relativa wrt de enzimas T. reesei

Temperatura (°C)	Actividad Relativa: β-glucanasa (CEA)	Actividad Relativa: T. reesei Celulasas/glucanasas
30	0,50	0,44
40	1,00	1,13
50	1,57	1,32
60	2,40	1,59

A temperaturas por encima de 40°C la actividad de celulasa/glucanasa de *T. reesei* inició a nivel apagado cuando se comparó con la β-glucanasa de *T. emersonii*. Por encima de 40°C la actividad divergió, siendo el CEA más activo. También, aunque la actividad relativa fue mayor a temperaturas elevadas, a temperaturas moderadas la actividad se mantuvo con relación a la mezcla de *T. reesei*. Esto ilustra el rango de amplias temperatura sobre el cual la β-glucanasa es activa.

Purificación y Actividad Específica

La purificación de la β-glucanasa de *T. emersonii* inició del filtrado. Aproximadamente 25 ml de un caldo libre de célula se desalinizó con una columna PD10 y se colocó sobre una columna de intercambio de anión de Q 6 ml de recurso que se equilibró en un amortiguador de acetato de sodio 10 mM (pH 5,0). La elusión se llevó a cabo con un gradiente lineal de 10-300 mM de amortiguador de acetato de sodio (pH 5,0). (El gradiente lineal A a B; tasa de flujo: 6 ml/min; tiempo de corrida: 54 min; longitud de onda monitor: 280 nm, 254 nm, 214 nm). Las fracciones activas se recolectaron (20 ml), se concentraron con concentradores Microsep (3,5 ml, 10 K) y lavadas dos veces con 0,1 M de amortiguador de fosfato de sodio (pH 5,0). La pureza de las fracciones se analizó mediante HPL-SEC (cromatografía de exclusión de tamaño) y SDS-PAGE.

Mediciones de actividad específica

El coeficiente de extinción molar calculado de la β-glucanasa a 280 nm es de 81550 M⁻¹.cm⁻¹. La concentración de proteína de la enzima purificada se derivó de las mediciones de E280 utilizando una absorción específica de E280^{1 cm}=2,33 para 1mg/ml. La actividad específica de la muestra purificada se determinó en BGU (sustrato: beta-glucano de cebada) y fue de 1.027 BGU/mg. Utilizando el método CPU la actividad específica fue de 628 unidades/mg. Como la actividad de acuerdo con el método viscométrico produjo un alto número en comparación con el método de azúcar reductor, éste concluyó que la β-glucanasa de *T. emersonii* exhibe una actividad de endo-glucanasa significativa. Una exo-glucanasa típica se desarrollaría muy bien en un ensayo de azúcar reductor aunque se desarrollaría muy mal en el ensayo de viscometría.

Punto Iso Eléctrico

El IEF-PAGE se desarrolló como sigue, el Equipo fue el sistema Fast (Farmacia Biotech), IEF 3-9 FastGel (Farmacia Biotech). Los geles fueron corridos y teñidos (Coomassie) de acuerdo a los métodos del sistema Fast estándar. El Punto Iso Eléctrico se determinó sobre un FastGel IEF3-9 y se cambió a 3,3.

Determinación del Peso Molecular

El SDS-PAGE se desarrolló como sigue. El equipo fue de nuevo el sistema Fast (Farmacia Biotech); 12,5% de geles homogéneos (Farmacia Biotech); tiras de amortiguador SDS (Farmacia Biotech). Tratamiento de muestra: un volumen (5 muestras) amortiguador (500 mM de Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 0,1% de azul bromo-fenol) se mezcló con 4 volúmenes de muestra y se hirvió durante 3 minutos. Los geles fueron corridos y teñidos (Coomassie) de acuerdo a los métodos del sistema Fast estándar. La cromatografía de exclusión de tamaño- HPLC se llevó a cabo utilizando una Columna: TSK G3000SW, cat. No. 05103 (TosoHaas). Método: los eluyentes fueron: 0,1 M de amortiguador de fosfato de sodio pH 7,0, tasa de flujo: 1 ml/min, Tiempo de corrida: 30 min, longitud de onda monitor: 280 nm. La desglicosilación de la enzima: mezcla 5 μl de enzima purificada (7 mg/ml) con 20 μl 0,5% de SDS y 25 μl de 1% β-mercaptoetanol. Esta mezcla se hirvió durante 4 minutos. Después de enfriar, se agregaron 20 μl de N-glicosidasa F (500 U/ml) y 20 μl de Triton X-100 al 3% en amortiguador de fosfato de sodio 1 M pH 7,0. Esto se incubó durante toda la noche y la desglicosilación se analizó con SDS-PAGE.

El peso molecular determinado sobre gel de SDS-PAGE y HP-SEC ue de 43 kDa. Después de la desglicosilación sobre SDS-PAGE se vio una banda recta de 37 kDa.

Termoestabilidad

La termoestabilidad T50 se determinó con las celulasas/glucanasas de *T. reesei* como referencia. T50 es la temperatura en la cual, después de 20 minutos de incubación, 50% de la actividad es dejada. La Tabla 4 muestra las diferencias en la termoestabilidad T50 entre la β -glucanasa purificada de *T. emersonii* y la mezcla de celulasas/glucanasas de *T. reesei* utilizadas anteriormente en este Ejemplo (actividad inicial se ajustó a uno; las enzimas se incubaron durante 20 minutos y después la actividad de enfriamiento se midió utilizando el método CPU). Cada experimento se repitió dos veces y así la Tabla 4 muestra las mediciones duplicadas. La termoestabilidad T50 de la β -glucanasa purificada descansa en alrededor de 93,4°C y la termoestabilidad T50 de la celulasas/glucanasas de *T. reesei* alrededor de 64,9°C.

TABLA 4

Termoestabilidad wrt enzimas T. reesei

Temperatura (°C)	Actividad Residual (%): celulasas/glucanasa <i>T. reesei</i>		Actividad Residual (%): β -glucanasa (CEA)	
	40	97	98	
50	96	100	100	99
60	85	83	100	99
70	14	14	98	95
75	0	0	93	96
80	0	0	88	90
85	0	0	89	94
90	0	0	65	64
110			0	0

Ejemplo 8

Mediciones de Actividad

Las dos cepas de colección que se identificaron en la viscoelección en el Ejemplo 6, utilizando un Xilano cascarilla de avena como un sustrato, se fermentaron en recipientes de agitación utilizando un medio GM (las cepas originales se marcaron AD009.21 y AD011.31). Además la cepa marcada AD021.B6 (CEA) se incluyó la cual se identificó en los Ejemplos 4 y 5 para expresar la actividad de β -glucanasa. Varios ensayos se desarrollaron y los resultados se muestran adelante. De manera sorprendente las cepas AD009.21 y AD011.31 mostraron poca actividad xilanas. Por el contrario parece que la AD009.21 y AD011.31 tienen actividad celulasas aunque los clones se identificaron en la viscoelección utilizando xilano cascarilla de avena. En particular la β D009.21 es muy activa sobre β -glucano de cebada.

TABLA 5

Agitación de fermentación de frasco de cepas de celulasas: Actividad de xilanas (EXU/ml), β -glucanasa (BGU/ml) y celulasas (CXU/ml)

Cepa (y designación de glucanasa)	EXU/ml	BGU/ml	CXU/ml
AD021.B6 (CEA)	< 10	160	524
AD009.21 (CEB)	< 10	884	254
AD011.31 (CEC)	< 10	< 10	7

ES 2 299 486 T3

Los límites de la detección se establecieron por debajo de 10 para los ensayos EXU y BGU, y 5 para el ensayo CXU.

5 Los análisis de ADN de las cepas AD 009.21 y AD 011.31 (como se describió anteriormente en el Ejemplo 6) mostraron dos nuevas de β -glucanasas, denominadas CEB y CEC. Las secuencias de nucleótido de las regiones codificantes son las SEQ ID Nos. 3 y 5 y las secuencias de aminoácido correspondientes son las SEQ ID Nos. 4 y 6, respectivamente.

10 La cepa CEB muestra alta actividad de β -glucanasa. La cepa CEA muestra una actividad de celulasa relativamente alta en comparación con la cepa CEB. La proporción entre la actividad de la de β -glucanasa y la actividad de la celulasa es diferente para CEA y CEB. La cepa CEC mostró actividad celulasa pero su actividad de β -glucanasa o xilanasas estuvo por debajo de los límites de detección en estos ensayos. Sin embargo, los estudios de homología sugieren fuertemente actividad de β -glucanasa, y se cree que ésta puede ser mucho más alta a diferente pH.

15 Utilizar más de un sustrato es factible para la selección. De manera sorprendente se notó que en lugar de dos sustratos a la vez, se podrían utilizar tres diferentes sustratos en la viscoelección. Uno de los sustratos fue una impureza de polímero de glucosa, probablemente glucano o material de celulosa. Se mostró que el uso del xilano cascarilla de avena, pectina y material similar a celulosa dio como resultado en la identificación de tres tipos de enzimas, xilanasas, pectinasas y celulasas en una ronda de selección. El ensayo viscométrico mantiene uno al otro gran ventaja con respecto al ensayo de detección de tinte común. Las bases del ensayo de detección de tinte sobre los tintes químicamente ligados a un sustrato. Esta clase de sustrato está comercialmente disponible para solamente unos pocos compuestos. El ensayo viscométrico, sin embargo, puede trabajar con cualquier tipo de sustrato viscoso, aún los naturales que no requieran ningún pre-tratamiento químico. Este aspecto es de importancia como, desde un punto de vista comercial e industrial, uno puede seleccionar para actividades de enzima sobre sustratos cuya viscosidad disminuye (es decir, jugos de fruta) o incremento de la viscosidad (es decir, productos de leche) es de importancia comercial.

30 Ejemplo 11

Una comparación de algunas de las propiedades moleculares y bioquímicas de las tres glucanasas se suministra en las Tablas de adelante.

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Glucanasa	PM (después de desglucosilación)	Longitud (residuos de aminoácido)	Actividad	Familia No. *	pH Óptimo	pI	Temperatura Óptima
CEA	43kDa (37 kDa)	335	3.2.1.4 (endoglucanasa)	5 (estructura 3D: barril α 8 β 8 TIM)	4.8	3.3 (4.5 ⁺)	85°C
2. CEB	44kDa ⁺	414	3.2.1.4 (endoglucanasa)	7 (estructura 3D: rollo β -gelatinoso)		4.2	> 75°C
CEC	23kDa ⁺	222	3.2.1.4 (endoglucanasa)	45 (estructura 3D: barril mezclado β)		4.0	> 75°C

* Basado en la clasificación glicosido hidrolasa (CAZy)
+ Predicción de la secuencia de aminoácido

ES 2 299 486 T3

Glucanasa/Celulasa	Familia	Actividades Conocidas	Actividades Conocidas	Conclusión
CEA	5	EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.75 EC 3.2.1.58 EC 3.2.1.78 EC 3.2.1.123	celulasa endo 1,6 glucanasa exo 1,3 glucanasa manasa endoglicoceramidasa	actividad BGU/CXU considerada improbable
CEB	7	EC 3.2.1.4 EC 3.2.1.91	celulasa celobiohidrolasa	actividad BGU/CXU considerada improbable
CEC	45	EC 3.2.1.4	celulasa	actividad BGU/CXU pero a diferente pH de aquel ensayado

Glucanasa/Celulasa	Familia	3D	Nucleófilo/Donador de Protón	Mecanismo
CEA	5	TIM 8	glu/glu	reteniendo
CEN	7	rollo gelatinoso	glu/glu	reteniendo
CEC	45	barril mezclado	asp/asp	invirtiendo
	16	rollo gelatinoso	glu/glu	reteniendo

CEB, CEC son todas celulasas que exhiben actividad EC 3.2.1.4. Muchas celulasas también pueden hidrolizar enlaces 1,4 en el glucan de cebada que las hace particularmente útiles para ciertas aplicaciones tales como por ejemplo, iluminar factores anti-nutricionales en la alimentación. Como la actividad se midió por vía del ensayo de viscosidad es probable que la celulasa exhiba endo actividad. Sin embargo no se puede excluir que también los enlaces 1,3 se hidrolicen. De esta manera, en las observaciones, las actividades EC 3.2.1.73, 3.2.1.39 y 3.2.1.6 no puedan ser reglamentadas aunque estas actividades se encuentren en la familia 16: las características de las familias 7 y 16 parecen muy similares.

Puramente como explicación, las celulasas (EC 3.2.1.4) son usualmente capaces de catalizar la endo hidrólisis de enlace 1,4-D-glucósido en celulosa. El nombre sistemático de las celulasas es 1,4-(2,3;1,4)-D-glucan 4-glucanohidrolasa. La endo-1,4-D-glucanasa y la endoglucanasa D son sinónimos de 1,4-(1,3;1,4)-D-glucan 4-glucanohidrolasa. La celulasa también puede hidrolizar enlaces 1,4 en D-glucanos que contienen también enlaces 1,3, que los hace particularmente útiles en ciertas aplicaciones tales como por ejemplo eliminar factores anti-nutricionales en la alimentación. Tales enzimas que exhiben actividad endo-glucanasa se denominan en general como glucanasas. Además la hidrólisis del glucano se puede lograr mediante liquenasa (1,3-1,4-D-glucan glucanohidrolasa (EC 3.2.1.73)) y endo-1,3(4)-glucanasa (1,3-(1,3;1,4)-D-glucan 3(4) glucanohidrolasa (EC 3.2.1.6)).

Una revisión de las actividades de celulasa se muestra en la Tabla de adelante.

Número EC	Actividad	Nombre Sistemático	Recomendado	Sinónimo
3.2.1.4	La endo Hidrólisis del	1,4-(1,3;1,4)-β-D-	celulasa	Endo-1,4-β-D-

5		enlace de 1,4- β -D-glucosídicos en celulosa. También hidroliza a los enlaces 1,4 en β -D-glucanos que también contienen enlaces 1,3.	glucan 4-glucanohidrolasa		glucanasa Endoglucanasa D
10					
15	3.2.1.73	Hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glicosídicos en β -D-glucanos que contienen enlaces 1,3 y 1,4. Actúan sobre liqueina y β -D-glucanos de cereal, pero no sobre β -D-glucanos que contienen solo enlaces 1,3 o solo, 1,4	1,3-1,4- β -D-glucan glucanohidrolasa	Liquenasa	
20					
25					
30	Número EC	Actividad	Nombre Sistemático	Recomendado	Sinónimo
35	3.2.1.39	Hidrólisis de los enlaces 1,3 β -D-glucosídicos en 1,3 β -D-glucanos. Actividad limitada sobre los glucanos mezclados (1,3-1,4) β -D-	1,3- β -D-glucano glucanohidrolasa	glucan endo-1,3- β -glucosidasa	endo 1,3 β -D-glucanasa β 1,3 glucanasa Oligo 1,3 glucosidasa
40					
45	3.2.1.58	Hidrólisis sucesiva de unidades de β -D-glucosa de los extremos no reductores de los 1,3- β -D-glucanos, liberando α -glucosa	1,3- β -D-glucano glucanohidrolasa	glucan 1,3- β -glucosidasa	exo β -1,3-glucanasa
50					
55					
60	3.2.1.75	Hidrólisis aleatoria de enlaces 1,6 y 1,6- β -D-glucósidos. Actúan sobre lutean, pustulan, 1,6-oligo- β -D-glucósidos	1,6- β -D-glucano glucanohidrolasa	glucan endo-1,6- β -glucosidasa	endo- β -1,6-glucanasa β -1,6-glucan hidrolasa
65					

3.2.1.6	Endohidrólisis de enlaces 1,3 o 1,4 en β -D-glucanos cuando el residuo de glucosa cuyo grupo reductor está involucrado en el enlace para ser hidrolizado es en sí mismo sustituido en C-3. Los sustratos incluyen D-glucanos de cereal, laminarían, liquenina	1,3-(1,3;1,4)- β -D-glucano 3(4) glucanohidrolasa	endo-1,3(4)- β -glucanasa	β -1,3-glucanasa beta- 1,3- 1,4-glucanasa endo- β , 1,3(4)-glucanasa
3.2.1.91	Hidrólisis de enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en celulosa y celotetraosa, liberando celobiosa del extremo no reductor	1,4-D-glucano celobiohidrolasa	celulosa 1,4- β -celobiosidasa	exoglucanas celobiohidrolasa exo-celobiohidrolasa

Referencias

1. **Sambrook et al.** (1989) "*Molecular Cloning: A laboratory manual*", 2nd Edición, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor. New York.
2. **Innis et al.** (1990) "*PCR protocols, a guide to methods and applications*" Academic Press, San Diego.
3. WO-A-99/32617
4. **Van Zeijl, C. et al.** (1998) *J. of Biotechnol.* 59: 221-224.
5. **Devereux et al.** (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395.
6. **Altschul S. F.** (1993) *J. Mol Evol* 36:290-300.
7. **Altschul S. F. et al.** (1990) *J. Mol Biol* 215:403-10.
8. **Henikoff and Henikoff** (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919)
9. **Karlin and Altschul** (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787.
10. **Cunningham and Wells**, *Science*, 244, 1081-1085, 1989.
11. **de Vos et al.** (*Science*, 255, 306-312, 1992).
12. **Smith et al.** (*J. Mol. Biol.*, 224, 899-904. 1992).
13. **Wlodaver et al.** (*FEBS Lett*, 309, 59-64, 1992).
14. **Ford et al.** *Protein Expression and Purification*, 2, 95-107, 1991.
15. **Goosen et al.**, "Transformation and Gene Manipulation in Filamentous Fungi: an overview" in: *Handbook of Mycology*. Vol. 4 (1992).
16. **Romanos et al.** *Yeast* 8:423-488 (1992).

ES 2 299 486 T3

17. EP-A-0,449,375

18. WO-A-98/04726

5 19. WO-A-98/30707

20. **Alenkso** and **Clutterbuck**, *Fungal Genet Biol* 21: 373-397 (1997).

21. EP-A-0,635,574

10 22. WO-A-98/46772

23. WO-A-91/14772

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 299 486 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido, que es una β -glucanasa obtenible de un hongo del género *Talaromices*, tal como el hongo *Talaromices emersonii*, que tiene la actividad EC 3.2.1.4 (actividad endoglucanasa), que comprende:
- (i) la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 2; o
 - 10 (ii) una variante de (i) que es capaz de dividir el β -D-glucano que tiene por lo menos 70% de identidad sobre la longitud completa de la SEQ ID No. 2 o por lo menos 80% sobre una región de por lo menos 150 aminoácidos de la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 2; o
 - (iii) un fragmento de (i) o (ii) que es capaz de dividir el β -D-glucano.
- 15 2. El polipéptido de acuerdo a la Reivindicación 1 en donde la variante (ii) tiene por lo menos 85% de identidad con la secuencia de aminoácido de la SEQ ID No. 2 y/o el fragmento de (iii) es de por lo menos 150 aminoácidos de longitud.
3. El polipéptido de acuerdo a la Reivindicación 1 que divide los enlaces (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4) y/o (1 \rightarrow 6) en β -D-glucano.
- 20 4. Un polinucleótido que comprende:
- (a) la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID No. 1 o una secuencia que codifica un polipéptido de acuerdo a cualquier reivindicación precedente;
 - 25 (b) una secuencia que es complementaria a, o que se hibrida bajo condiciones de alta exigencia, una secuencia como se definió en (a) sobre la longitud completa;
 - (c) una secuencia modificada de la SEQ ID No. 1 con hasta 100 sustituciones de nucleótido que codifica un polipéptido que tiene una actividad β -Glucanasa.
 - 30 (d) una secuencia que tiene por lo menos 75%, preferiblemente 80%, de identidad con una secuencia como se definió en (a); o
 - 35 (e) una secuencia que se degenera como resultado del código genético a una cualquiera de las secuencias como se definió en (a).
5. El polinucleótido de acuerdo a la Reivindicación 4 en donde la secuencia codifica un polipéptido que tiene actividad β -glucanasa.
- 40 6. El polinucleótido de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 5, que es una secuencia de ADN.
7. Un vector que comprende una secuencia de polinucleótido de acuerdo a una cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 6.
- 45 8. El vector de acuerdo a la Reivindicación 7, que es un vector de expresión, tal como donde una secuencia de ADN de acuerdo con la Reivindicación 7 está operablemente ligada a la secuencia regulatoria.
9. Una célula huésped, que comprende, como una secuencia heteróloga, un polinucleótido de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 4 a 6.
- 50 10. Una célula huésped, que expresa, como una proteína heteróloga, un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.
11. Una célula huésped transformada con la secuencia de ADN de la Reivindicación 5 o un vector de la Reivindicación 7.
- 55 12. un proceso para producir un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, el proceso comprende cultivar una célula huésped como se definió en cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 11 bajo condiciones que suministran para la expresión del polipéptido.
- 60 13. El uso de un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 para la elaboración de un medicamento para tratar hiperlipidemia y/o niveles altos de colesterol y triglicéridos en el suero en un individuo.
- 65 14. Un método para identificar un compuesto que modula la actividad de β -glucanasa, el método comprende poner en contacto un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 o 3 con un compuesto de prueba y monitorear la actividad de β -glucanasa.

ES 2 299 486 T3

15. Una composición que comprende un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.

16. La composición de acuerdo a la Reivindicación 15, que comprende además un polipéptido que tiene actividad de celulasa, endo- β -arabinanasa, ramnogalacturonasa o poligalacturonasa.

5

17. Un método para tratar material vegetal, el método comprende poner en contacto el material vegetal con un polipéptido de acuerdo a una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 o una composición de acuerdo a la Reivindicación 15 o Reivindicación 16.

10 18. Un método de acuerdo a la Reivindicación 17 en donde el tratamiento comprende degradar o modificar la celulosa, tal como β -glucan, en el material vegetal.

19. Un método de acuerdo a la Reivindicación 18 para degradar o modificar las paredes de la célula vegetal.

15 20. Un método de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 19 en donde el tratamiento comprende dividir unas subunidades de glucosa de un componente de β -D-glucan del material.

20 21. Un método de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 19 en donde el material comprende una planta, una pulpa de planta, extracto de planta o un alimento comestible o ingrediente de éste, o una tela, textil o prendas que contienen material vegetal.

25 22. Un método para reducir la viscosidad del material vegetal, el método comprende poner en contacto el material vegetal con un polipéptido de acuerdo a una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 o una composición de acuerdo a la Reivindicación 15 o Reivindicación 16 en una cantidad y bajo condiciones efectivas para degradar la celulosa contenida en el material.

23. Uso de un polipéptido de acuerdo a una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 o una composición de acuerdo a la Reivindicación 15 o Reivindicación 16 en un método para tratar el material vegetal.

30 24. Uso de acuerdo a la Reivindicación 23 en donde el tratamiento comprende dividir los polímeros de β -D-glucano en el material vegetal.

35 25. Uso de un polipéptido de acuerdo a una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 o una composición de acuerdo a la Reivindicación 15 o Reivindicación 16 en un método para procesar pulpa, jugo o extracto de planta cuyo método comprende incubar la pulpa, jugo o extracto con el polipéptido o composición a por lo menos celulosa parcialmente degradada.

40 26. Un alimento (animal) que comprende un polipéptido de acuerdo a una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.

27. Uso de un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en preparación de cerveza, destilado, biometanación, higiene dental, tratamiento de cuero, manufactura de papel, tratamiento o manufactura textil, horneado y elaboración de pan, lavado o tratamiento con detergente, tratar bulbos de flores o en alimento animal.

45 28. Un alimento o material que comprende un polipéptido de acuerdo a cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3.

29. Un alimento o un material de acuerdo a la Reivindicación 28, que es una bebida alcohólica, pan, masa o té.

30. Un organismo de planta transgénica que comprende una célula de acuerdo a la Reivindicación 10 u 11.

50

55

60

65

ES 2 299 486 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> DSM NV
- 5 <120> BETA GLUCANASA NOVEDOSA
- <130> N78454A
- 10 <140>
- <141>
- <150> GB00302263.9
- 15 <151> 2000-03-20
- <160> 8
- 20 <170> PatentIn version 3.0
- <210> 1
- <211> 1008
- 25 <212> ADN
- <213> *Talaromyces emersonii*
- <220>
- 30 <221> CDS
- <222> (1)..(1008)
- 35 <400> 1

```

40      atg aag ttc agc agg gtc gtg tgc ggt ctg acg gcc gca ggg ggc gcc 48
      Met Lys Phe Ser Arg Val Val Cys Gly Leu Thr Ala Ala Gly Gly Ala
      1          5          10          15

      ctc gcc gct cca gtc aag gag aag ggc atc aag aag cgg gcg tct ccg 96
      Leu Ala Ala Pro Val Lys Glu Lys Gly Ile Lys Lys Arg Ala Ser Pro
      20          25          30

45      ttt caa tgg ttc gga tcc aac gag tct ggc gca gag ttt ggg aac aac 144
      Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Asn Asn
      35          40          45

      aac atc cct ggc gtg gag ggc acc gac tac acc ttc ccc aac acg agc 192
      Asn Ile Pro Gly Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Pro Asn Thr Ser
      50          55          60

      gcc atc cag atc ctc atc gac cag ggc atg aac atc ttc cgc gtg ccg 240
      Ala Ile Gln Ile Leu Ile Asp Gln Gly Met Asn Ile Phe Arg Val Pro
      65          70          75          80

      ttc ctg atg gag cgc atg gtg ccc aac cag atg acg ggg ccg gtg gat 288
      Phe Leu Met Glu Arg Met Val Pro Asn Gln Met Thr Gly Pro Val Asp
      85          90          95

```

ES 2 299 486 T3

5 tcg gcg tat ttc cag ggc tac agc cag gtt atc aac tac att acc agc 336
 Ser Ala Tyr Phe Gln Gly Tyr Ser Gln Val Ile Asn Tyr Ile Thr Ser
 100 105 110

10 cat ggc gcg tcg gca gtg att gac ccg cat aac ttc ggg cga tac tac 384
 His Gly Ala Ser Ala Val Ile Asp Pro His Asn Phe Gly Arg Tyr Tyr
 115 120 125

15 aac aat atc atc tcc tcg ccg tct gac ttc cag act ttc tgg cac act 432
 Asn Asn Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp His Thr
 130 135 140

20 att gcg tcc aac ttt gcg gat aat gac aat gtc att ttc gac acg aac 480
 Ile Ala Ser Asn Phe Ala Asp Asn Asp Asn Val Ile Phe Asp Thr Asn
 145 150 155 160

25 aac gaa tac cac gac atg gac gaa agc ctt gtc gtc cag ctc aac cag 528
 Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Glu Ser Leu Val Val Gln Leu Asn Gln
 165 170 175

30 gcc gcc atc gac ggc atc cgc gcc gcg ggc gcc aca tca cag tac atc 576
 Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ala Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile
 180 185 190

35 ttc gtc gag ggc aac tcg tgg acc ggg gcc tgg aca tgg acg cag gtc 624
 Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Gln Val
 195 200 205

40 aac gac gcg atg gcg aac ctg acg gac ccg cag aac aag atc gtg tac 672
 Asn Asp Ala Met Ala Asn Leu Thr Asp Pro Gln Asn Lys Ile Val Tyr
 210 215 220

45 gag atg cac cag tac ctg gac tcg gac ggg tcg ggc acg tcg gac cag 720
 Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Asp Gln
 225 230 235 240

50 tgc gtc aac tcg acc atc ggg cag gac cgc gtc gag tcg gcg acg gcc 768
 Cys Val Asn Ser Thr Ile Gly Gln Asp Arg Val Glu Ser Ala Thr Ala
 245 250 255

55 tgg ctg aag cag aac ggc aag aag gcg atc ctg ggc gag tac gct gcc 816
 Trp Leu Lys Gln Asn Gly Lys Lys Ala Ile Leu Gly Glu Tyr Ala Gly
 260 265 270

60 ggc gcc aac agc gtg tgc gag acg gcc gtc acc ggc atg ctc gac tat 864
 Gly Ala Asn Ser Val Cys Glu Thr Ala Val Thr Gly Met Leu Asp Tyr
 275 280 285

65 ctc gcc aac aat act gat gtc tgg acc ggt gct atc tgg tgg gcg gct 912
 Leu Ala Asn Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala Ala
 290 295 300

70 ggg ccg tgg tgg gga gac tat atc ttc tcc atg gag ccg cct agt ggg 960
 Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Pro Ser Gly
 305 310 315 320

75 att gcg tat gag cag gtt ctg ccg ttg ctg aag ccg tac ctc gaa tga 1008
 Ile Ala Tyr Glu Gln Val Leu Pro Leu Leu Lys Pro Tyr Leu Glu
 325 330 335

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

65 <213> *Talaromyces emersonii*

ES 2 299 486 T3

<400> 2

5 Met Lys Phe Ser Arg Val Val Cys Gly Leu Thr Ala Ala Gly Gly Ala
 1 5 10
 Leu Ala Ala Pro Val Lys Glu Lys Gly Ile Lys Lys Arg Ala Ser Pro
 20 25 30
 10 Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Asn Asn
 35 40 45
 Asn Ile Pro Gly Val Glu Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Pro Asn Thr Ser
 50 55 60
 15 Ala Ile Gln Ile Leu Ile Asp Gln Gly Met Asn Ile Phe Arg Val Pro
 65 70 75 80
 Phe Leu Met Glu Arg Met Val Pro Asn Gln Met Thr Gly Pro Val Asp
 85 90 95
 20 Ser Ala Tyr Phe Gln Gly Tyr Ser Gln Val Ile Asn Tyr Ile Thr Ser
 100 105 110
 25 His Gly Ala Ser Ala Val Ile Asp Pro His Asn Phe Gly Arg Tyr Tyr
 115 120 125
 Asn Asn Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp His Thr
 130 135 140
 30 Ile Ala Ser Asn Phe Ala Asp Asn Asp Asn Val Ile Phe Asp Thr Asn
 145 150 155 160
 Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Glu Ser Leu Val Val Gln Leu Asn Gln
 165 170 175
 35 Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ala Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile
 180 185 190
 40 Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Gln Val
 195 200 205
 Asn Asp Ala Met Ala Asn Leu Thr Asp Pro Gln Asn Lys Ile Val Tyr
 210 215 220
 45 Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Asp Gln
 225 230 235 240
 Cys Val Asn Ser Thr Ile Gly Gln Asp Arg Val Glu Ser Ala Thr Ala
 245 250 255
 50 Trp Leu Lys Gln Asn Gly Lys Lys Ala Ile Leu Gly Glu Tyr Ala Gly
 260 265 270
 55 Gly Ala Asn Ser Val Cys Glu Thr Ala Val Thr Gly Met Leu Asp Tyr
 275 280 285
 Leu Ala Asn Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala Ala
 290 295 300
 60 Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Pro Ser Gly
 305 310 315 320
 65 Ile Ala Tyr Glu Gln Val Leu Pro Leu Leu Lys Pro Tyr Leu Glu
 325 330 335

ES 2 299 486 T3

<210> 3

<211> 1245

<212> ADN

5 <213> *Talaromyces emersonii*

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(1245)

<400> 3

15
 atg gat cga att ctt gcg ctg atc ttg gtc ccc ctt gcc act gtc acg 48
 Met Asp Arg Ile Leu Ala Leu Ile Leu Val Pro Leu Ala Thr Val Thr
 1 5 10 15

20
 gca cag cag att gcc act atc ccc gag gtc cat ccc aag ctc ccg aca 96
 Ala Gln Gln Ile Gly Thr Ile Pro Glu Val His Pro Lys Leu Pro Thr
 20 25 30

25
 tgg aaa tgc acg acc gag gcc ggc tgt gtc cag cag aat acc tcc gtc 144
 Trp Lys Cys Thr Thr Glu Gly Gly Cys Val Gln Gln Asn Thr Ser Val
 35 40 45

30
 gtg ttg gag tac ctg tcc cat ccc atc cat gaa gtt gga aac agc gac 192
 Val Leu Glu Tyr Leu Ser His Pro Ile His Glu Val Gly Asn Ser Asp
 50 55 60

35
 gtc tcc tgc gtg gtt tct gcc ggc ctg aac cag agc ctc tgt ccc aac 240
 Val Ser Cys Val Val Ser Gly Gly Leu Asn Gln Ser Leu Cys Pro Asn
 65 70 75 80

40
 gaa gag gaa tgt tcc aaa aac tgc gtc gtc gag ggg gcc aac tac acc 288
 Glu Glu Glu Cys Ser Lys Asn Cys Val Val Glu Gly Ala Asn Tyr Thr
 85 90 95

45
 agc tcc gga gtt cac aca gac gcc gat gcc ctg act ctc aat cag tac 336
 Ser Ser Gly Val His Thr Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Asn Gln Tyr
 100 105 110

50
 gtc acg aac gcc gac cag gtc gtc acc gcc tcc ccg cgg gtc tat ctc 384
 Val Thr Asn Gly Asp Gln Val Val Thr Ala Ser Pro Arg Val Tyr Leu
 115 120 125

55
 ctg gcc agc gac gac gag gac ggg aat tac agc atg ctc cag ctc ctc 432
 Leu Ala Ser Asp Asp Glu Asp Gly Asn Tyr Ser Met Leu Gln Leu Leu
 130 135 140

60
 gcc cag gag ctg agc ttt gac gtg gac gtc tcc aaa ctg gtc tgc ggg 480
 Gly Gln Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Lys Leu Val Cys Gly
 145 150 155 160

65
 atg aac gcc gcc ttg tat ctc tcc gag atg gac gca tcc gcc gcc cga 528
 Met Asn Gly Ala Leu Tyr Leu Ser Glu Met Asp Ala Ser Gly Gly Arg
 165 170 175

70
 aac agc ctc aac ccg gcg ggg gca cag tat gcc tct gga tac tgt gat 576
 Asn Ser Leu Asn Pro Ala Gly Ala Gln Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp
 180 185 190

ES 2 299 486 T3

gcg caa tgc ggc gtc cag ccc ttc atc aac ggc acg gtc aac acc gcc 624
 Ala Gln Cys Gly Val Gln Pro Phe Ile Asn Gly Thr Val Asn Thr Gly
 195 200 205

5 tcg ctc ggc gct tgc tgc aac gag atg gac atc tgg gaa gcg aat gcc 672
 Ser Leu Gly Ala Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ala
 210 215 220

10 ctt gcc acc gcg ttg act ccg cac ccg tgc agc gtc acc agc atc tat 720
 Leu Ala Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Ser Val Thr Ser Ile Tyr
 225 230 235 240

15 gcc tgt tct ggc gct gag tgc ggc tcc aac ggc gtc tgc gac aag ccg 768
 Ala Cys Ser Gly Ala Glu Cys Gly Ser Asn Gly Val Cys Asp Lys Pro
 245 250 255

20 gga tgc gga tac aac ccg tac gcg ctg gga gac cac aac tac tac gga 816
 Gly Cys Gly Tyr Asn Pro Tyr Ala Leu Gly Asp His Asn Tyr Tyr Gly
 260 265 270

25 ccc ggg aag acg gtc gac acg tcc agg ccc ttc acc gtg gta acg cag 864
 Pro Gly Lys Thr Val Asp Thr Ser Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln
 275 280 285

30 ttt ctc acc aac gac aac acc acg acg ggg act ctg acg gag atc cgt 912
 Phe Leu Thr Asn Asp Asn Thr Thr Thr Gly Thr Leu Thr Glu Ile Arg
 290 295 300

35 cgt ctg tac gtc caa gac ggc aac gtg atc ggg cct tcg cct agc gac 960
 Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly Asn Val Ile Gly Pro Ser Pro Ser Asp
 305 310 315 320

40 tct gtc tcg tca atc acg gac tcg ttc tgt tcc acg gtg gat tcc tat 1008
 Ser Val Ser Ser Ile Thr Asp Ser Phe Cys Ser Thr Val Asp Ser Tyr
 325 330 335

45 ttc gag ccg ctt ggc ggc ctg aag gag atg ggc gag gcg ctg ggt cgg 1056
 Phe Glu Pro Leu Gly Gly Leu Lys Glu Met Gly Glu Ala Leu Gly Arg
 340 345 350

50 ggg atg gtg ctg gtg ttc agc atc tgg aat gat cct ggt cag ttc atg 1104
 Gly Met Val Leu Val Phe Ser Ile Trp Asn Asp Pro Gly Gln Phe Met
 355 360 365

55 aac tgg ctc gac agc ggg aat gct ggg ccc tgc aac agc acc gag ggg 1152
 Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Asn Ser Thr Glu Gly
 370 375 380

60 aac cca gcg act att gaa gcg cag cat cct gac acc gcg gtg acc ttc 1200
 Asn Pro Ala Thr Ile Glu Ala Gln His Pro Asp Thr Ala Val Thr Phe
 385 390 395 400

65 tcg aac atc aga tgg ggg gat atc ggg tcg acg ttc cag tcg taa 1245
 Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Phe Gln Ser
 405 410

<210> 4

<211> 414

<212> PRT

<213> *Talaromyces emersonii*

ES 2 299 486 T3

<400> 4

5 Met Asp Arg Ile Leu Ala Leu Ile Leu Val Pro Leu Ala Thr Val Thr
1 5 10

Ala Gln Gln Ile Gly Thr Ile Pro Glu Val His Pro Lys Leu Pro Thr
20 25 30

10 Trp Lys Cys Thr Thr Glu Gly Gly Cys Val Gln Gln Asn Thr Ser Val
35 40 45

Val Leu Glu Tyr Leu Ser His Pro Ile His Glu Val Gly Asn Ser Asp
50 55 60

15 Val Ser Cys Val Val Ser Gly Gly Leu Asn Gln Ser Leu Cys Pro Asn
65 70 75 80

20 Glu Glu Glu Cys Ser Lys Asn Cys Val Val Glu Gly Ala Asn Tyr Thr
85 90 95

Ser Ser Gly Val His Thr Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Asn Gln Tyr
100 105 110

25 Val Thr Asn Gly Asp Gln Val Val Thr Ala Ser Pro Arg Val Tyr Leu
115 120 125

Leu Ala Ser Asp Asp Glu Asp Gly Asn Tyr Ser Met Leu Gln Leu Leu
130 135 140

30 Gly Gln Glu Leu Ser Phe Asp Val Asp Val Ser Lys Leu Val Cys Gly
145 150 155 160

35 Met Asn Gly Ala Leu Tyr Leu Ser Glu Met Asp Ala Ser Gly Gly Arg
165 170 175

Asn Ser Leu Asn Pro Ala Gly Ala Gln Tyr Gly Ser Gly Tyr Cys Asp
180 185 190

40 Ala Gln Cys Gly Val Gln Pro Phe Ile Asn Gly Thr Val Asn Thr Gly
195 200 205

Ser Leu Gly Ala Cys Cys Asn Glu Met Asp Ile Trp Glu Ala Asn Ala
210 215 220

45 Leu Ala Thr Ala Leu Thr Pro His Pro Cys Ser Val Thr Ser Ile Tyr
225 230 235 240

50 Ala Cys Ser Gly Ala Glu Cys Gly Ser Asn Gly Val Cys Asp Lys Pro
245 250 255

Gly Cys Gly Tyr Asn Pro Tyr Ala Leu Gly Asp His Asn Tyr Tyr Gly
260 265 270

55 Pro Gly Lys Thr Val Asp Thr Ser Arg Pro Phe Thr Val Val Thr Gln
275 280 285

Phe Leu Thr Asn Asp Asn Thr Thr Thr Gly Thr Leu Thr Glu Ile Arg
290 295 300

60 Arg Leu Tyr Val Gln Asp Gly Asn Val Ile Gly Pro Ser Pro Ser Asp
305 310 315 320

65 Ser Val Ser Ser Ile Thr Asp Ser Phe Cys Ser Thr Val Asp Ser Tyr
325 330 335

ES 2 299 486 T3

Phe Glu Pro Leu Gly Gly Leu Lys Glu Met Gly Glu Ala Leu Gly Arg
 340 345 350
 5 Gly Met Val Leu Val Phe Ser Ile Trp Asn Asp Pro Gly Gln Phe Met
 355 360 365
 Asn Trp Leu Asp Ser Gly Asn Ala Gly Pro Cys Asn Ser Thr Glu Gly
 370 375 380
 10 Asn Pro Ala Thr Ile Glu Ala Gln His Pro Asp Thr Ala Val Thr Phe
 385 390 395 400
 Ser Asn Ile Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Phe Gln Ser
 405 410
 15

<210> 5

20 <211> 669

<212> ADN

<213> *Talaromyces emersonii*

25 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(669)

30 <400> 5

atg aat gtc aga gct gtt gtc tct gtt tct gcc ttc ttg ctg acg cct 48
 35 Met Asn Val Arg Ala Val Val Ser Val Ser Ala Phe Leu Leu Thr Pro
 1 5 10 15
 ttg gct tca gcc ctg acc gga acc acc aca aca aca tgg gac tgt tgt 96
 40 Leu Ala Ser Ala Leu Thr Gly Thr Thr Thr Thr Trp Asp Cys Cys
 20 25 30
 aaa cca gcg tgt agc tgg acg caa aat gcc caa gca ggc gga gca agt 144
 45 Lys Pro Ala Cys Ser Trp Thr Gln Asn Ala Gln Ala Gly Gly Ala Ser
 35 40 45
 ggt acc gtc gcc acc tgc aac atc aac aac cag gta ctc agc aat ggt 192
 50 Gly Thr Val Ala Thr Cys Asn Ile Asn Asn Gln Val Leu Ser Asn Gly
 50 55 60
 gcc tct gct ccc agc gcc tgc cag gga ggc gat gcc tac agc tgc tcc 240
 65 Ala Ser Ala Pro Ser Ala Cys Gln Gly Gly Asp Ala Tyr Ser Cys Ser
 65 70 75 80
 gac ttc cag ccc atc atc atc agt gac acg ttg tgg tac gga ttc gct 288
 55 Asp Phe Gln Pro Ile Ile Ile Ser Asp Thr Leu Ser Tyr Gly Phe Ala
 85 90 95
 ggc aac tgg gag aca agc aac tgc tgc aag tgc ttc cag ttc acc tgg 336
 60 Gly Asn Trp Glu Thr Ser Asn Cys Cys Lys Cys Phe Gln Phe Thr Trp
 100 105 110
 acg tcg ggg gcg ggt gcg ggc aag tcc atg atc gtc caa gtt gtc aat 384
 65 Thr Ser Gly Ala Gly Ala Gly Lys Ser Met Ile Val Gln Val Val Asn

ES 2 299 486 T3

5 Gly Val Gly Asp Tyr Asn Ala Cys Thr Ser Gln Tyr Gly Ala Pro Pro
 145 150 155 160

10 Gln Gly Trp Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Cys
 165 170

15 Asp Gln Leu Pro Ser Ile Leu Gln Pro Gly Cys His Trp Arg Phe Glu
 180 185 190

20 Trp Ala Gly Gly Gly Ile Asn Gly Trp Thr Thr Glu Tyr Glu Glu Val
 195 200 205

25 Asp Cys Pro Ser Gln Leu Thr Ser Ile Ser Gly Cys Tyr Pro
 210 215 220

<210> 7

20 <211> 28

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> cebador oligonucleótido

<400> 7

30

tatagcgaaa tggattgatt gtacgctc

<210> 8

35 <211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> cebador oligonucleótido

<400> 8

45

atccccagca tcattacacc tcagtg

50

55

60

65