(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 368 165**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/385 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C13K 1/02 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06789521 .9**
(96) Fecha de presentación: **04.08.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1928901**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2008**

(54) Título: **POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD DE BETA-GLUCOSIDASA Y POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LOS MISMOS.**

(30) Prioridad:
04.08.2005 US 705607 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.11.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.11.2011

(73) Titular/es:
NOVOZYMES, INC.
1445 DREW AVENUE
DAVIS, CA 95618, US;
KROGH, KRISTIAN y
HARRIS, PAUL

(72) Inventor/es:
KROGH, Kristian y
HARRIS, Paul

(74) Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 368 165 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa y polinucleótidos que codifican los mismos

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de beta-glucosidasa y a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácido nucleico, vectores y células huéspedes que comprenden los polinucleótidos así como métodos para producir y usar los polipéptidos.

Descripción de las técnicas relacionadas

[0002] La celulosa es un polímero de la glucosa de azúcar simple unido covalentemente por enlaces beta-1,4. Muchos microorganismos producen enzimas que hidrolizan los betaglucanos. Estas enzimas incluyen endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas. Las endoglucanasas digieren el polímero de celulosa en lugares aleatorios, abriéndolo al ataque por parte de celobiohidrolasas. Las celobiohidrolasas liberan secuencialmente moléculas de celobiosa de los extremos del polímero de celulosa. La celobiosa es un dímero de glucosa de enlace beta 1,4 hidrosoluble. Las beta-glucosidasas hidrolizan celobiosa a glucosa.

[0003] La conversión de materias primas celulósicas en etanol tiene las ventajas de la disponibilidad de grandes cantidades de materia prima, la conveniencia de evitar la quema o el vertido de los materiales y la limpieza del combustible de etanol. La madera, los residuos agrícolas, los brotes herbáceos y los residuos sólidos municipales han sido considerados materias primas para la producción de etanol. Estos materiales consisten principalmente en celulosa, hemicelulosa y lignina. Una vez que la celulosa se convierte en glucosa, la glucosa es fácilmente fermentada por levadura en etanol. Ya que la glucosa es fácilmente fermentada a etanol por una variedad de levaduras mientras que la celobiosa no lo es, cualquier celobiosa restante al final de la hidrólisis representa una pérdida de rendimiento de etanol. De manera más importante, la celobiosa es un inhibidor potente de endoglucanasas y celobiohidrolasas. La acumulación de celobiosa durante la hidrólisis es extremadamente indeseable para la producción de etanol.

[0004] La acumulación de celobiosa ha sido un problema importante en la hidrólisis enzimática porque los microorganismos productores de celulasa puede producir poca beta-glucosidasa. La baja cantidad de beta-glucosidasa produce un déficit de capacidad para hidrolizar la celobiosa a glucosa. Se han utilizado diferentes métodos para aumentar la cantidad de beta-glucosidasa en la conversión de celulosa a glucosa.

[0005] Un método es producir beta-glucosidasa usando microorganismos que producen poca celulasa y añadir la beta-glucosidasa exógenamente a endoglucanasa y celobiohidrolasa para mejorar la hidrólisis. No obstante, las cantidades requeridas son demasiado costosas para una biomasa comercial a operación de etanol.

[0006] Un segundo método es llevar a cabo hidrólisis de celulosa simultáneamente con fermentación de la glucosa por levadura. Este proceso es conocido como sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). En un sistema SSF, la fermentación de la glucosa la extrae de la solución. No obstante, los sistemas SSF aún no están comercialmente disponibles debido a que la temperatura operativa para la levadura de 28 °C es demasiado baja para las condiciones de 50°C requeridas.

[0007] Un tercer método para superar la escasez de beta-glucosidasa es sobreexpresar la beta-glucosidasa en un huésped, aumentando así el rendimiento de la beta-glucosidasa.

[0008] WO 2005/047499 describe polipéptidos de Aspergillus fumigatus que tienen actividad de beta-glucosidasa y polinucleótidos que codifican la misma.

[0009] Sería una ventaja en la técnica identificar beta-glucosidasas nuevas que tengan propiedades mejoradas para convertir materiales celulósicos en monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.

[0010] Es un objeto de la presente invención proporcionar nuevos polipéptido que tengan actividad de beta-glucosidasa y polinucleótidos que codifiquen los polipéptidos.

Resumen de la invención

[0011] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de beta-glucosidasa y con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado como aminoácidos 37 a 878 de SEC ID n.º: 2;

[0012] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos anteriores con actividad de beta-glucosidasa.

[0013] En otro aspecto preferido, la secuencia codificante de polipéptido maduro son los nucleótidos 171 a 2753 de SEC ID n.º: 1.

[0014] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes, células huéspedes recombinantes que comprenden los polinucleótidos, y los métodos de producir los polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa.

[0015] La presente invención también se refiere a unas planta que comprende los polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa.

[0016] La descripción también se refiere a métodos para usar los polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa en la conversión de material celulósico a glucosa u otras sustancias.

[0017] La descripción también se refiere a composiciones detergentes que comprenden polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A y 1B muestran la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de una beta-glucosidasa cepa *Penicillium brasilianum* IBT 20888 (SEC ID NOs: 1 y 2, respectivamente).

La Figura 2 muestra un mapa de restricción de pCR2.1GH3A.

La Figura 3 muestra un mapa de restricción de pKKAB.

La Figura 4 muestra un mapa de restricción de pKBK01.

La Figura 5 muestra la actividad relativa del beta-glucosidasa cepa *Penicillium brasilianum* IBT 20888 a valores de pH diferentes como una función de la temperatura.

La Figura 6 muestra la actividad relativa de la beta-glucosidasa cepa *Penicillium brasilianum* IBT 20888 a temperaturas diferentes como una función del pH.

La Figura 7 muestra la actividad residual de Novozym 188 después de 24 horas de incubación a temperaturas y pHs diferentes.

La Figura 8 muestra la actividad residual de la beta-glucosidasa *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888 después de 24 horas de incubación a temperaturas y pHs diferentes.

La Figura 9 muestra la velocidad de reacción inicial a diferentes concentraciones de 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranosa para la beta-glucosidasa cepa *Penicillium brasilianum* IBT 20888.

La Figura 10 muestra la velocidad de reacción inicial a diferentes concentraciones de celobiosa para la beta-glucosidasa cepa *Penicillium brasilianum* IBT 20888.

Definiciones

[0019] Actividad de beta-glucosidasa: El término "beta-glucosidasa" es definido en la presente como una glucohidrolasa de beta-D-glucósido (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no reductores terminales con la liberación de beta-D-glucosa. La celobiasa es sinónimo de beta-glucosidasa. Para objetivos de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasase determina a 25°C usando 1 mM de 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranósido como sustrato en 50 mM citrato sódico pH 4,8. Una unidad de actividad de beta-glucosidasa es definida como 1.0 µmole de 4-nitrofenol producido por minuto a 25°C, pH 4.8.

[0020] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, e incluso más preferiblemente al menos 100% de la actividad de beta-glucosidasa del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como aminoácidos 37 a 878 de SEC ID n.º: 2.

[0021] Hidrolasa de glucósido de familia 3 o familia GH3: El término "Familia GH3" o "Familia 3 glicosida hidrolasa" o “Cel3" es definida en la presente como un polipéptido que cae dentro de la familia 3 de glucósido hidrolasa según Henrissat B., 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat y Bairoch, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695- 696.

[0022] Polipéptido aislado: El término polipéptido aislado según se utiliza en este caso se refiere a un polipéptido que es al menos un 20% puro, preferiblemente al menos un 40% puro, más preferiblemente al menos un 60% puro, incluso más preferiblemente al menos un 80% puro, más preferiblemente al menos un 90% puro, e incluso más preferiblemente al menos un 95% puro, según lo determina la SDS-PAGE.

[0023] Polipéptido substancialmente puro: El término “polipéptido sustancialmente puro” denota en la presente una preparación de polipéptido que contiene como máximo el 10%, preferiblemente como máximo el 8%, más preferiblemente como máximo el 6%, más preferiblemente como máximo el 5%, más preferiblemente como máximo el 4%, más preferiblemente como máximo el 3%, incluso más preferiblemente como máximo el 2%, más preferiblemente como máximo el 1% e incluso más preferiblemente como máximo el 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el cual está asociado originalmente o de manera recombinante. Es preferible, en consecuencia, que el polipéptido substancialmente puro sea al menos un 92% puro, preferiblemente al menos un 94% puro, más preferiblemente al menos un 95% puro, más preferiblemente al menos un 96% puro, más preferiblemente al menos un 96% puro, más preferiblemente al menos un 97% puro, más preferiblemente al menos un 98%, incluso más preferiblemente al menos

un 99%, más preferiblemente al menos un 99,5% puro e incluso más preferiblemente un 100% puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación.

[0024] Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en forma “esencialmente pura”, es decir, que la preparación de polipéptido esté esencialmente libre de otra materia polipeptídica con la cual esté asociado originalmente o de manera recombinante. Este se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

[0025] En la presente, el término “polipéptido sustancialmente puro” es sinónimo de los términos “polipéptido aislado” y

"polipéptido en forma aislada".

[0026] Polipéptido maduro: El término “polipéptido maduro” es definido en la presente como un polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa que está en su forma final después de la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como tratamiento del N-terminal, truncamiento del C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc

[0027] Secuencia codificante del polipéptido maduro: El término “secuencia codificante del polipéptido maduro” se define en la presente como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de beta-glucosidasa.

[0028] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro “identidad”.

[0029] Para objetivos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos es determinado el paquete de programa de FASTA, versión 3.4 (Pearson y D. J. Lipman, 1988, PNAS 85:2444, y Pearson, 1990, Methods in Enzymology 183:63) usando parámetros predeterminados. Los alineamientos de parejas del algoritmo Smith-Waterman del paquete (Waterman et al., 1976, Adv. Math. 20: 367) se utilizaron para la determinación de la identidad en porcentaje. Los parámetros predeterminados incluiyeron una penalización de apertura de gaps de -12, una penalización de extensión de gaps de -2, y la matriz de comparación BLOSUM50.

[0030] Para objetivos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina por el método de Wilbur-Lipman (Wilbur and Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) usando el software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineación múltiple: Penalización por gaps de 10 y penalización por longitud de gaps de 10. Los parámetros de alineación por parejas son Ktuple = 3, penalización por gaps = 3 y ventanas = 20.

[0031] Fragmento polipeptídico: El término “fragmento polipeptídico” es definido en la presente como un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos delecionados del extremo amino y/o carboxilo de la SEC ID n.º: 2 o una secuencia homóloga del mismo, caracterizado por el hecho de que el fragmento tiene actividad de beta-glucosidasa. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 720 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 760 residuos de aminoácidos y más preferiblemente al menos 800 residuos de aminoácidos.

[0032] Subsecuencia: El término “subsecuencia” es definido en la presente como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o más nucleótidos delecionados del extremo 5' y/o 3' de la SEC ID n.º: 1 o una secuencia homóloga de la misma, donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 2160 nucleótidos, más preferiblemente al menos 2280 nucleótidos, y más preferiblemente al menos 2400 nucleótidos.

[0033] Variante alélica: El término "variante alélica” denota en la presente cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación y puede suponer polimorfismo dentro de las poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0034] Polinucleótido aislado: El término “polinucleótido aislado” según se utiliza en este caso se refiere a un polinucleótido que es al menos un 20% puro, preferiblemente al menos un 40% puro, más preferiblemente al menos un 60%, puro, incluso más preferiblemente al menos un 80% puro, de la forma más preferible al menos un 90% puro e incluso de la forma más preferible al menos un 95% puro, según lo determina la electroforesis de agarosa.

[0035] Polinucleótido substancialmente puro: El término “polinucleótido sustancialmente puro” según se utiliza en este caso se refiere a una preparación de polinucleótido libre de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para el uso dentro de los sistemas de producción de proteínas creadas genéticamente. De este modo, un polinucleótido substancialmente puro contiene como máximo el 10%, preferiblemente como máximo el 8%, más preferiblemente como máximo el 6%, más preferiblemente como máximo el 5%, más preferiblemente como máximo el 4%, más preferiblemente como máximo el 3%, incluso más preferiblemente como máximo el 2%, más preferiblemente como máximo el 1% e incluso más preferiblemente como máximo el 0,5% en peso de otra materia polinucleótida con la cual está asociado originalmente o de manera recombinante. Un polinucleótido substancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido substancialmente puro sea al menos un 90% puro, preferiblemente al menos un 92% puro, más preferiblemente al menos un 94% puro, más preferiblemente al menos un 95% puro, más preferiblemente al menos un

96% puro, más preferiblemente al menos un 97%, puro, incluso más preferiblemente al menos un 98% puro, de la forma más preferible al menos un 99% e incluso de la forma más preferible al menos un 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos descritos en la presente estén en forma "esencialmente pura", es decir, que la preparación de polinucleótido esté esencialmente libre de otra materia polinucleótida con la cual está asociado originalmente o de manera recombinante. En la presente, el término "polinucleótido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada". Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0036] ADNc: El término "ADNc" es definido en la presente como una molécula de ADN que puede ser preparada por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura dividida obtenida de una célula eucariótica. El ADNc no tiene secuencias de intrón que normalmente están presentes en el ADN genómico correspondiente La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor de ARNm que se procesa a través de una serie de fases antes de aparecer como ARNm maduro empalmado. Estas fases incluyen la eliminación de secuencias de intrón por un proceso llamado empalme. El ADNc derivado de ARNm en consecuencia carece de cualquier secuencia de intrón.

[0037] Constructo de ácidos nucléicos: El término "constructo de ácidos nucléicos" según se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, única o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o que es modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos que de otra manera no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucléicos es sinónimo del término "cassette de expresión" cuando el constructo de ácidos nucléicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0038] Secuencia de control: El término "secuencias de control" es definido en la presente para incluir todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o nativa o extranjera entre sí. Las secuencias de control de este tipo incluyen, entre otras, la secuencia de poliadenilación líder, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de terminación transcripcionales y traduccionales. Las secuencias de control pueden ser provistas de enlaces con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0039] Operativamente enlazado: El término "operativamente enlazado" denota en la presente una configuración en la cual una secuencia de control se coloca en una posición apropiada en relación a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótido de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0040] Secuencia codificante: Cuando se usa en la presente el término "secuencia codificante", significa una secuencia de nucleótidos que directamente especifica la secuencia de aminoácidos de su producto de proteína. Los bordes de la secuencia codificante son determinados generalmente por un marco de lectura abierto, que normalmente se inicia con el codón de iniciación ATG o codones de iniciación alternativos tales como GTG y TTG y extremidades con un codón de detención tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser una secuencia de ADN, de ADNc, o de nucleótidos recombinantes.

[0041] Expresión: El término "expresión" incluye cualquier fase implicada en la producción del polipéptido incluidas, entre otras, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

[0042] Vector de expresión: El término "vector de expresión" es definido en la presente como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención, y que está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que permiten su expresión.

[0043] Célula huésped: El término "célula huésped", según se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula susceptible a transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucléicos o vector de expresión que comprenda un polinucleótido de la presente invención.

[0044] Modificación: El término "modificación" significa en la presente cualquier modificación química del polipéptido que consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 2 o una secuencia homóloga de la misma al igual que la manipulación genética del ADN que codifica ese polipéptido. La modificación puede ser sustituciones, deleciones y/o inserciones de uno o más aminoácidos al igual que sustituciones de una o más cadenas laterales del aminoácido.

[0045] Variante artificial: Cuando se usa en la presente, el término "variante artificial" significa un polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa producida por un organismo que expresa una secuencia de nucleótidos modificada de la secuencia codificante del polipéptido maduro SEC ID n.º: 1 o una secuencia homologa de la misma. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana por modificación de la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC ID n.º: 1 o una secuencia homologa de la misma.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa

[0046] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad al polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 2 de al menos 95%, e incluso de forma más preferible al menos 96%, 97%, 98%, o 99%, que tienen actividad de beta-glucosidasa (en adelante, "polipéptidos homólogos"). En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere por diez aminoácidos, preferiblemente por cinco aminoácidos, más preferiblemente por cuatro aminoácidos, incluso más preferiblemente por tres aminoácidos, más preferiblemente por dos aminoácidos, e incluso más preferiblemente por un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID n: 2.

[0047] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 2 o un fragmento de la misma que tenga actividad de beta-glucosidasa. En un aspecto preferido, un polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido comprende el polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido comprende los aminoácidos 37 a 878 de la SEC ID n.º: 2 o un fragmento de la misma que tenga actividad de beta-glucosidasa. En otro aspecto preferido, un polipéptido comprende los aminoácidos 37 a 878 de la SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 2 ; o un fragmento de la misma que tenga actividad de beta-glucosidasa. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en los aminoácidos 37 a 878 de la SEC ID n.º: 2 ; o un fragmento de la misma que tenga actividad de beta-glucosidasa. En otro aspecto preferido, un polipéptido consiste en los aminoácidos 37 a 878 de la SEC ID n.º: 2.

[0048] En un aspecto preferido, la secuencia codificante de polipéptido maduro son los nucleótidos 171 a 2753 de SEC ID nº: 1.

[0049] La secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 1 o una subsecuencia de la misma, al igual que la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2 o un fragmento de la misma, puede ser usado para diseñar una sonda de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifican polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, las sondas de este tipo pueden ser usadas para la hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos de transferencia estándar de Southern, para identificar y aislar el gen correspondiente allí. Las sondas de este tipo pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deben ser al menos 14, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35, y más preferiblemente al menos 70 nucleótidos en longitud. No obstante, se prefiere que la sonda de ácido nucleico sea de al menos 100 nucleótidos en longitud. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede ser de al menos 200 nucleótidos, preferiblemente al menos 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos, o más preferiblemente al menos 500 nucleótidos en longitud. Incluso se pueden utilizar sondas más largas, p. ej., sondas de ácido nucleico que sean de al menos 600 nucleótidos, preferiblemente al menos 700 nucleótidos, más preferiblemente al menos 800 nucleótidos, o más preferiblemente al menos 900 nucleótidos en longitud. Se pueden utilizar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas normalmente están marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S, biotina o avidina).

[0050] Un ADN genómico o biblioteca de ADNc obtenido a partir de estos otros organismos puede, en consecuencia, ser seleccionado para ADN que se hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa. El ADN genómico u otro ADN de estos otros organismos puede ser separado por electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede ser transferido e inmovilizado en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN homólogo con la SEC ID n.º: 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

[0051] Para objetivos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibrida a una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID n.º: 1, la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n.º 1, su cadena complementaria, o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia al menos muy baja a muy alta. Las moléculas a las cuales la sonda de ácido nucleico se hibrida bajo estas condiciones pueden ser detectadas usando, por ejemplo, película radiográfica.

[0052] La sonda de ácido nucleico puede ser la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1. La sonda de ácidos nucleicos es de los nucleótidos171 a 2753 de SEC ID n.º: 1. La sonda de ácidos nucleicos puede ser una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de la SEC ID n.º: 2, o una subsecuencia de la misma. La sonda de ácido nucleico puede ser SEC ID n.º: 1. La sonda de ácido nucleico puede ser la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1. La sonda de ácidos nucleicos puede ser la secuencia de polinucleótidos contenida en el plásmido pKKAB que está contenido en *E. coli* NRRL B-30860.

[0053] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia muy baja a muy alta son definidas como prehibridación e hibridación a 42 ºC en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y bien 25% de formamida para astringencias muy bajas y bajas, 35% de formamida para astringencias medias y medias-altas, o 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0054] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador finalmente es lavado tres veces cada una durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente al menos a 45 ºC (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50ºC (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55 ºC (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60 ºC (astringencia media-alta), incluso más preferiblemente al menos a 65 ºC (astringencia alta) y de forma mas preferible al menos a 70 ºC (astringencia muy alta).

[0055] Para las sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación, y lavado post-hibridación a aproximadamente 5 ºC a aproximadamente 10 ºC por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 48:: 1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de tris-HCl pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de sodio fosfato monobásico, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0056] Para las sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SCC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos usando 6X SSC a 5 ºC a 10 ºC por debajo de la T_m calculada.

[0057] La presente invención se refiere a variantes artificiales que comprenden una sustitución, deleción y/o inserción conservadora de uno o más aminoácidos de la SEC ID n.º: 2 o una secuencia homóloga de la misma. Preferiblemente, los cambios de los aminoácidos son de una naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al pliegue y/o a la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, normalmente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino-terminales o carboxi-terminales, tal como un residuo de metionina aminoterminal; un pequeño péptido de enlace de hasta 20-25 residuos aproximadamente; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0058] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos acídicos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y pequeños aminoácidos (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). En la técnica se conocen sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en The Proteins, Academic Press, New York. Los cambios de aparición más frecuentes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

[0059] Además de los 20 aminoácidos estándar, los aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, los aminoácidos que no son codificados por el código genético y los aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos. Los “aminoácidos no naturales” han sido modificados después de la síntesis de proteína, y/o tienen una estructura química en su/s cadena/s lateral/es diferente de la de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales pueden ser sintetizados químicamente y preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido pipecólico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3 y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.

[0060] De forma alternativa, los cambios de los aminoácidos son de una naturaleza tal que las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos son alteradas. Por ejemplo, los cambios de los aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0061] Los aminoácidos esenciales en el polipéptido progenitor pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). 1081- 1085). En ésta técnica, las mutaciones simples de alanina se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para detectar la actividad biológica (es decir, actividad de betaglucosidasa) para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Ver también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también pueden ser determinados por análisis físico de la estructura, como lo determinan las técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o mareaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 99-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas de análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

[0062] Las sustituciones de aminoácidos simples o múltiples pueden ser realizadas y evaluadas utilizando métodos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988 Science 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que pueden ser usados incluyen PCR propensa al error, exposición en el fago (p. ej., Lowman et al., 1991, Biochem. 30: 30: 10832-10837; Patente U.S. n.º. 5 223 409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Nen et al., 1988, ADN 7: 127).

[0063] Los métodos de mutagénesis/redistribución pueden ser combinados con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huéspedes (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican los polipéptidos activos pueden ser recuperadas de las células huéspedes y ser rápidamente ordenadas usando métodos estándares de la técnica. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y pueden ser aplicados a polipéptidos de estructura desconocida.

[0064] La cantidad total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 2, tales como aminoácidos 37 a 878 de la SEC ID n.º: 2, es 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como máximo 6, más preferiblemente 5, más preferiblemente 4, incluso más preferiblemente 3, de la forma más preferible 2 e incluso de la forma más preferible 1.

[0065] En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido *Penicillium brasilianum* con actividad de beta-glucosidasa. En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido *Penicillium brasilianum* IBT 20888 con actividad de beta-glucosidasa, por ejemplo, el polipéptido de SEC ID n.º: 2 o el polipéptido maduro del mismo.

[0066] Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión seccionables en los cuales otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado es producido fusionando una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) codificando otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén dentro del marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del/los mismo/s promotor/es y terminador.

[0067] Ejemplos de sitios de escisión incluyen, entre otros, un sitio Kex2 que codifica el dipéptido Lys-Arg (Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-76 ; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251 ; Rasmussen- Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493 ; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503 ; and Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381), un sitio Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg , que se divide por una proteasa de factor Xa después del residuo de arginina (Eaton et al., 1986, Biochem. 25: 505-512); un sitio Asp-Asp-Asp-Asp-Ly, que está dividido por una enteroquinasa después de la lisina (Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987); un sitio de His-Tyr-Glu o His-Tyr-Asp, que está dividido por Genenase I (Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248); un sitio Leu- Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que está dividido por trombina después del Arg (Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48); un sitio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly site, que está dividido por la proteasa TEV después de Gln (Stevens, 2003, *supra*); y un sitio Leu-Glu- Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que está divivido por una forma proteasa 3C de rinovirus humano genéticamente creada después del Gln (Stevens, 2003, *supra).*

Polinucleótidos

[0068] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención con actividad de beta-glucosidasa.

[0069] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la SEC ID n.º: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia contenida en el plásmido pKKAB que está contenido en E. coli NRRL B-30860. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la región codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 1. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en nucleótidos 171 a 2753 de la SEC ID nº: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la región codificante del polipéptido maduro contenida en el plásmido pKKAB que está contenido en *E. coli* NRRL B-30860. La presente invención también incluye secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de la SEC ID n.º: 1 o la secuencia codificante del polipéptido maduro de la misma en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de la SEC ID n.º: 1 que codifican fragmentos de la SEC ID n.º: 2 que tiene actividad endoglucanasa.

[0070] La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 1, en la cual la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de la SEC ID n.º: 2. En un aspecto preferido, el polipéptido maduro son los aminoácidos 37 a 878 de la SEC ID n.º: 2.

[0071] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento del ADN genómico, la preparación de ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de ese ADN genómico puede ser efectuada, p. ej. usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bien conocida o selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.,*1990, *PCR: A Guide to Methods and Application,* Academic Press, New York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación basada en la secuencia de nucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos pueden ser clonados a partir de una cepa de *Penicillium*, u otro organismo o un organismo relacionado y de ese modo, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especie de la región codificante del polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0072] . En un aspecto preferido, la secuencia codificante de polipéptido madura son los nucleótidos 171 a 2753 de SEC ID nº: 1.

[0073] Puede ser necesaria la modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que no están presentes de manera natural. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera creada genéticamente del polipéptido aislado de su fuente nativa*, p. ej.*, variantes artificiales que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La secuencia de la variante puede estar construida sobre la base de la secuencia de nucleótidos presentada como la región codificante del polipéptido de la SEC ID n.º: 1, *p. ej*., una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponde al uso del codón del organismo huésped destinado para la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para obtener una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase, *p. ej*., Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0074] Resultará evidente para los expertos en la técnica que las sustituciones de este tipo pueden ser realizadas fuera de las regiones críticas a la función de la molécula y aún así darán como resultado un polipéptido activo. Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado de la invención, y, en consecuencia, preferiblemente no sometidos a la sustitución, pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (ver, *p. ej*., Cunningham y Wells, 1989, *supra).* En esta última técnica, las mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para detectar actividad de beta-glucosidasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción de sustrato-enzima también pueden ser determinados por análisis de la estructura tridimensional como lo determinan técnicas tales como análisis por resonancia magnética nuclear, cristalografía o mareaje por fotoafinidad (véase, por ej, de Vos *et al.,* 1992, *supra;* Smith *et al.,* 1992,*supra;* Wlodaver *et al.,* 1992, *supra).*

Constructos de ácidos nucleicos

[0075] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazados a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0076] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser manipulado en una variedad de maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar las secuencias de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son bien conocidas en la técnica.

[0077] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que sea reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia del promotor contiene secuencias de control transcripcional que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y pueden ser obtenidos a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0078] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos a partir del lac operon de E. coli, gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de alfa-amilasa *de Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de penicilinasa de *Bacillus licheniformis* (*penP*), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* y gen procariótico de beta lactam*asa* (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Otros promotores son descritos en Useful proteins from recombinant bacteria en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, *supra*.

[0079] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped filamentosa fúngica son promotores obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus niger o Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Arspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae,* acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusaium venenatum* (WO 00/56900), *Fusaiíum venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa tipo tripsina de *Fusaríum oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los

promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* e triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0080] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, *ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de Saccharomyces cerevisiae (TPI), metalotionina de Saccharomyces* cerevisiae (CUP1) y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huéspedes de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0081] La secuencia de control también puede ser una secuencia del terminador de la transcripción adecuado, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia del terminador está operativamente enlazada al 3' término de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección puede ser usado en la presente invención.

[0082] Los terminadores preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa tipo tripsina *de Fusarium oxysporum*

[0083] Los terminadores preferidos para células huéspedes de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-dehidrogenasa fosfato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células huéspedes de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0084] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5' término de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. En la presente invención se puede utilizar cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección.

[0085] Líderes preferidos para células huéspedes fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergilius oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergilius nidulans*.

[0086] Los líderes adecuados para células huéspedes de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, fosfoglicerato-quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae.*

[0087] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3' término de la secuencia de nucleótidos y que, transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito En la presente invención se puede utilizar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección.

[0088] Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células huéspedes fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergilius oryzae*, *glucoamilasa de Aspergilius niger, antranilato sintasa de Aspergilius nidulans, proteasa tipo tripsina de Fusarium* oxysporum y alfa- glucosidasa de *Aspergilius niger.*

[0089] Secuencias de poliadenilación útiles para células huéspedes de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

[0090] La secuencia de control puede también ser una región codificante del péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos vinculada al término amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una región codificante del péptido señal naturalmente vinculado en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal foránea puede ser requerida donde la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal foránea puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para incrementar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección, es decir, secretada en un medio de cultivo, puede ser usada en la presente invención.

[0091] Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huéspedes bacterianas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutrales (*nprT, nprS, nprM*) de *Bacillus stearothermophilus*, y prsA de *Bacillus subtilis*. Más péptidos señales se describen por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

[0092] Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huéspedes filamentosas fúngicas son las regiones codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de

Aspergillus niger, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

[0093] En un aspecto preferido, el péptido señal son los aminoácidos 1 a 19 de SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, la región de codificación de péptido señal son los nucleótidos 6 a 62 de SEC ID n.º: 1 que codifica los aminoácidos 1 a 19 de SEC ID n.º: 2.

[0094] Péptidos señales útiles para células huéspedes de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes útiles que codifican el péptido señal se describen por Romanos et al., 1992, *supra.*

[0095] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el término amino de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede ser convertido en un polipéptido maduro activo por ruptura catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido puede ser obtenida de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0096] En un aspecto preferido, el propéptido son los aminoácidos 20 a 36 de SEC ID N.º: 2. En un aspecto preferido, la región codificante del propéptido es los nucleótidos 63 a 170 de la SEC ID n.º: 1, o la secuencia de ADNc de la misma, que codifica los aminoácidos 20 a 36 de SEC ID n.º: 2.

[0097] Cuando ambas regiones del péptido señal y regiones del propéptido están presentes en el término amino de un polipéptido, la región del propéptido está situada junto al término amino de un polipéptido y la región del péptido señal está situada junto al término amino de la región del propéptido.

[0098] También puede ser conveniente añadir secuencias reguladoras que permiten la regulación de la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que causan que la expresión del gen sea activada o desactivada en respuesta a un estímulo químico o físico, incluida la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac, y *trp*. En levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor TAKA de alfa-amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* puede ser usado como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten la amplificación del gen. En sistemas eucarióticos, éstas incluyen el gen de la dihidrofolato-reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de la metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifican la beta-glucosidasa estaría operativamente vinculada con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0099] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinante que comprenden unncia de nucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las diferentes secuencias de control y de ácidos nucléicos anteriormente descritas se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos en tales sitios. De forma alternativa, la secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucléicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente vinculada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0100] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la cual el vector será introducido. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

[0101] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, está integrado en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el que ha sido integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0102] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas y similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofía a auxótrofos y similares.

[0103] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de B*acillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o

tetraciclina Marcadores adecuados para células huéspedes de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para el uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, entre otros, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), bar (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), sC (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Preferidos para el uso en una célula del *Aspergillus* son los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces higroscopicus*.

[0104] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento(s) que permite(n) integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0105] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. De forma alternativa, el vector puede contener secuencias de ácidos nucleicos adicionales para dirigir la integración por

recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación o ubicaciones precisas en el/los cromosoma/s. Para aumentar la probabilidad de integración a una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente 400 a 10.000 pares de bases, y de forma más preferible 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad con la secuencia diana correspondiente para incrementar la probabilidad de recombinación homologa. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homologa con la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otra parte, el vector puede ser integrado en el genoma de la célula huésped por recombinación no homologa.

[0106] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que le permita al vector replicarse de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" se define en este caso como una secuencia de nucleótidos que permite a un plásmido o vector replicarse *in vivo*.

[0107] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli* y pUB110; pE194; pTA1060, y pAMß1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0108] Ejemplos de orígenes de replicación para el uso en una célula huésped de levadura son los orígenes de replicación de 2 micrones, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0109] Ejemplos de un replicador de plásmido útil en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0110] Se puede insertar más de una copia de una polinucleótidos de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucléotido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con los nucleótidos donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y, por tanto, las copias adicionales del polinucleótido, pueden seleccionarse cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0111] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinante de la presente invención son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Células huéspedes

[0112] La presente invención también se refiere a células huéspedes recombinantes, que comprenden un polinucléotido aislado de la presente invención que son ventajosamente usadas en la de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector es mantenido como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se auto-replica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" comprende cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped depende en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0113] La célula huésped puede ser cualquier microorganismo unicelular, por ejemplo, un procariota o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

[0114] Los microorganismos unicelulares útiles son células bacterianas tal como bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas. Las bacterias Gram positivas incluyen, entre otras, *Bacillus, Streptococcus, Streptomyces, Staphylococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Clostridium, Geobacillus y Oceanobacillus.* Las bacterias

Gram negativas incluyen, entre otras, *E. coli, Pseudomonas, Salmonella, Campylobacter, Helicobacter, Flavobacterium, Fusobacterium, Ilyobacter, Neisseria y Ureaplasma*.

[0115] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*. Las células de *Bacillus* útiles en la práctica de la presente invención incluyen, entre otras, células de *Bacillus alkalophilus, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus brevis, Bacillus circulans, Bacillus clausii, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus lautus, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus stearothermophilus, Bacillus subtilis y Bacillus thuringiensis*.

[0116] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus lentus, Bacillus licheniformis, Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En un aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una cálula de *Bacillus clausii*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus licheniformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus subtilis*.

[0117] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Streptococcus*. Las células de *Streptococcus* útil en la práctica de la presente invención incluyen, entre otros, *Streptococcus equisimilis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus uberis y Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus.*

[0118] En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptococcu equisimilis*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptococcus pyogenes*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula *Streptococcus uberis*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0119] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Streptomyces*. Las células de Streptomyces útiles en la práctica de la presente invención incluyen, entre otras, *Streptomyces achromogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces coelicolor, Streptomyces griseus y Streptomyces lividans.*

[0120] En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula *Streptomyces achromogenes*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces avermitilis*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces coelicolor*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces griseus*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces lividans*.

[0121] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, ser efectuado por transformación de protoplasto (véase ,por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young and Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829 , o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751), o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E coli* puede, por ejemplo, ser efectuado por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede, por ejemplo, ser efectuado por transformación de protoplasto y electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, ser efectuado por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo and Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede, por ejemplo, ser efectuado por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Catt and Jollick, 1991, Microbios. 68: 189-2070, por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (véase, *por ejemplo,* Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). No obstante, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula huésped.

[0122] La célula huésped puede también ser un eucariota, tal como un mamífero, insecto, planta, o célula fúngica.

[0123] La célula huésped puede ser cualquier célula fúngica. "Hongo" según se utiliza en este caso incluye el filo Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (según la definición de Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8º edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual que el Oomycota (según se cita en Hawksworth *et al*., 1995, supra, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, *supra.).*

[0124] En una forma de realización preferida, la célula fúngica huésped es una célula de levadura. "Levadura", según se utiliza en este caso, incluye levadura ascosporogénea (Endomycetales), levadura basidiosporogénea y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los objetivos de la presente invención, la levadura será definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M. y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0125] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de Candida, Hansenula, *Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0126] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus, Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica.*

[0127] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según se define por Hawksworth et Al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos generalmente están caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0128] En un aspecto incluso más preferido, la célula fúngica filamentosa huésped es, entre otras, una célula de *Acremonium, Aspergillus, Aureobasidium, Bjerkandera, Ceriporiopsis, Coprinus, Coriolus, Cryptococcus*, *Filibasidium, Fusarium, Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Phlebia, Piromyces, Pleurotus, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trametes,* o*Trichoderma*.

[0129] En un aspecto más preferido, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Aspergillus awamori, Aspergillus fumigatus, Aspergillus foetidus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sporotrichioides, Fusarium sulphureum, Fusarium torulosum, Fusarium trichothecioides o Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped filamentosa fúngica es una célula de *Bjerkandera adusta, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis aneirina, Ceriporiopsis caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Coprinus cinereus, Coriolus hirsutus, Humicola insolens, Humicola lanuginosa, Mucor miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium purpurogenum, Phanerochaete chrysosporium, Phlebia radiata, Pleurotus eryngii, Thielavia terrestris, Trametes villosa, Trametes versicolor, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei o Trichoderma viride*.

[0130] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de protoplastos y la regeneración de la de pared celular en una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de las células huéspedes de *Aspergillus* y *Trichoderma* están descritos en EP 238 023 y Yelton et al, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier et al., 1989; Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede ser transformada usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, páginas182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0131] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la célula es del género *Penicillium*, más preferiblemente *Penicillium brasilianum*, y de forma más preferible *Penicillium brasilianum* IBT 20888.

[0132] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

[0133] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutante con al menos una mutación en la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n,º: 2, y (b) recuperación del polipéptido. En un aspecto preferido, el polipéptido maduro son los aminoácidos 37 a 878 de la SEC ID n.º: 2.

[0134] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación en pequeña escala o gran escala (incluidas fermentaciones continuas, de lote, en flujo discontinuo, o fermentaciones en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo se desarrolla en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se

pueden preparar según composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es segregado en el medio, se puede recuperar de lisatos celulares.

[0135] Los polipéptidos pueden ser detectados usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

[0136] El polipéptido resultante se puede recuperar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede ser recuperado del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluidos, entre otros, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0137] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluidos, entre otros, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, por afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoque y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos substancialmente puros.

Plantas

[0138] La presente invención también se refiere a una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal que ha sido transformada con un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa de la presente invención para expresar y producir ell polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o parte de planta. De forma alternativa, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido recombinante puede ser utilizado como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutritivo, de apetencia y propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

[0139] La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea. Ejemplos de plantas de monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de prados (poa pratense, Poa), hierba forrajera tal como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz.

[0140] Ejemplos de plantas de dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, moldura y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia de Brassicaceae), tales como coliflor, semilla de colza y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0141] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutas, semillas y tubérculos, al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos específicos de la célula vegetal, como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma también son considerados parte de una planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera una parte de una planta. De igual modo, las partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también son consideradas partes de la planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

[0142] También está incluida dentro del campo de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0143] La planta transgénica o célula vegetal que exprese un polipéptido de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En breve, la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión que codifica un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped o genoma de crotoplasto de la planta y propaga la planta modificada o célula vegetal resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

[0144] Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente vinculada con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huéspedes en las cuales el constructo de expresión ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esto depende del método de introducción de ADN que se utilizará).

[0145] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias de terminador y promotor y opcionalmente secuencias de tránsito o señal, está determinada, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea expresar el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de fase o tejido, y el producto genético puede ser dirigido a un tejido o parte de planta específica tal como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague et al.,1988, Plant Physiology 86: 506.

[0146] Para la expresión constitutiva pueden utilizarse el 355-CaMV, la ubiquitina 1 de maíz y el promotor de la actina 1 del arroz (Franck et Al., 1980, 285-294 , Christensen et al.,_ 1992, Plant Mo. Biol. 18: 675-689 ; Zhang et al., 1991, Plant Cell 3: 1155-1165). Los promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos

sumideros de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutas (Eduardos & Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303) o de tejidos sumideros metabólicos tales como meristemas (Ito et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como el promotor de glutelina, prolamina, globulina o albúmina de arroz (Wu et al., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocido de Vicia *faba* (Conrad et al., 1998, Journal of Plant Physiology 152: 708-711), un promotor de una proteína de cuerpo de aceite de semilla (Chen et al., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 935-941), el promotor napA de proteína de almacenamiento *de Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser una promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcs* de arroz o tomate (Kyozuka et al., 1993, Plant Physiology 102: 991-1000, el promotor del gen de metiltransferasa de adenina de virus chlorella (Mitra y Higgins, 1994, Plant Molecular Biology 26: 85-93), o el promotor de gen *aldP* de arroz (Kagaya et al., 1995, Molecular and General Genetics 248: 668-674), o un promotor inducible por lesiones tal como el promotor pin2 de la patata (Xu et al., 1993, Plant Molecular Biology 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en salinidad o inducido por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de planta tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico y metales pesados.

[0147] También puede utilizarse un elemento intensificador del promotor para conseguir mayor expresión de un polipéptido de la presente invención en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador del promotor puede ser un intrón que es colocado entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu et al., 1993, s*upra*, describen el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

[0148] El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.

[0149] El constructo de ácido nucleico se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluida la transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser et al., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274: 274).

[0150] Actualmente, la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para obtener un resumen, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38) y también puede ser usada para transformar monocotiledóneas, aunque frecuentemente se utilizan otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas de tungsteno u oro microscópico revestidas con el ADN transformante) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant Journal 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplasto como se describe por Omirulleh et al, 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428.

[0151] Después de la transformación, los transformantes que hayan incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0152] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

Eliminación o reducción de actividad de beta-glucosidasa

[0153] Los polinucleótidos de la invención se pueden utilizar en métodos para producir un mutante de una célula madre, que comprende la interrupción o la eliminación de una secuencia polinucleótida, o una parte de la misma, codificando un polipéptido de la presente invención, que provoca que la célula mutante produzca menos del polipéptido que la célula madre cuando es cultivada bajo las mismas condiciones.

[0154] La célula mutante se puede construir reduciendo o eliminando la expresión de eliminación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, inserciones, interrupciones, sustituciones o deleciones. En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos es inactivada. La secuencia de nucleótidos a ser modificada o inactivada puede ser, por ejemplo, la región de codificación o una parte de la misma esencial para la actividad, o un elemento regulador requerido para la expresión de la región de codificación. Un ejemplo de tal secuencia reguladora de control o puede ser una secuencia del promotor o una parte funcional de la misma, es decir, una parte que sea suficiente para la expresión de afectación de la secuencia de nucleótidos. Otras secuencias de control para modificación posible incluyen, entre otras, una guía, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, secuencia de péptido señal, terminador de transcripción y transcripcional activador.

[0155] La modificación o inactivación de la secuencia de nucleótidos se puede realizar sometiendo la célula madre a mutagénesis y seleccionando células mutantes en las que la expresión de la secuencia de nucleótidos ha sido reducida o eliminada. La mutagénesis, que puede ser aleatoria o específica, puede ser realizado, por ejemplo, usando un agente mutagenizante químico o físico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis puede ser realizada usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes.

[0156] Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para este fin incluyen irradiación ultravioleta (UV) , hidroxilamina, N-metilo-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metilo hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico y análogos de nucleótidos.

[0157] Cuando tales agentes son usados, la mutagénesis se realiza típicamente incubando la célula madre a ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas, y seleccionando y/o escogiendo células mutantes que muestren una expresión reducida o ninguna expresión del gen.

[0158] La modificación o inactivación de la secuencia de nucleótidos se puede realizar por introducción, sustitución o eliminación de uno o más nucleótidos en el gen o un elemento regulador requerido para la transcripción o traducción del mismo. Por ejemplo, los nucleótidos puede ser insertados o quitados para suponer la introducción de un codón de terminación, la eliminación del codón de inicio, o un cambio en el marco de lectura abierto. Tal modificación o inactivación se puede realizar por mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis generada por PCR conforme a métodos conocidos en la técnica. Aunque, en principio, la modificación puede realizarse *in vivo*, es decir, directamente en la célula que expresa la secuencia de nucleótidos a ser modificada, se prefiere que la modificación se realizada *in vitro* como se ejemplifica más abajo.

[0159] Un ejemplo de un modo conveniente de eliminar o reducir la expresión de una secuencia de nucleótidos por una célula se basa en técnicas de sustitución génica, deleción génica o interrupción génica. Por ejemplo, en el método de interrupción génica, una secuencia de ácidos nucléicos correspondiente a la secuencia de nucleótidos endógena es mutagenizada *in vitro* para producir una secuencia de ácidos nucléicos defectuosa que luego es transformada en la célula madre para producir un gen defectuoso. Por recombinación homóloga, la secuencia de ácidos nucléicos defectuosa reemplaza la secuencia de nucleótidos endógena. Puede ser conveniente que la secuencia de nucleótidos defectuosa también codifique un marcador que se puede utilizar para la selección de transformantes en el que la secuencia de nucleótidos ha sido modificada o destruida. En un aspecto particularmente preferido, la secuencia de nucleótidos se interrumpe con un marcador seleccionable tales como los descritos aquí.

[0160] De forma alernativa, la modificación o la inactivación de la secuencia de nucleótidos se puede realizar por técnicas de antisentido o RNAi establecidas usando una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos. Más especificamente, la expresión de la secuencia de nucleótidos por una célula se puede reducir o eliminar por introducción de una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos del gen que puede ser transcrito en la célula y es capaz de hibridizar al ARNM producido en la célula. Bajo condiciones que permitan que la secuencia de nucleótidos antisentido complementaria hibridice al ARNM, la cantidad de proteína traducida es así reducida o eliminada.

[0161] La descripción se refiere a una célula mutante de una célula madre que comprende una interrupción o eliminación de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o una secuencia de control de la misma, que provoca que la célula mutante produzca menos polipéptido o ningún polipéptido en comparación con la célula madre.

[0162] Las células mutantes deficitarias de polipéptido así creadas son particularmente útiles como células huéspedes para la expresión de polipéptidos homólogos y/o heterólogos. Por lo tanto, la descripción además se refiere a métodos para producir un polipéptido homólogo o heterólogo que comprende: (a) cultivp de la célula mutante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. El término "polipéptidos heterólogos" es definido en este caso como polipéptidos que son no nativos de la célula huésped, una proteína nativa en la cual se han realizado modificaciones para alterar la secuencia nativa o una proteína nativa cuya expresión es alterada de forma cuantitativa como resultado de una manipulación de la célula huésped mediante técnicas de ADN recombinante.

[0163] La descripción se refiere a un método para la producción de un producto proteínico esencialmente libre de actividad de beta-glucosidasa por fermentación de una célula que produce tanto un polipéptido de la presente invención como el producto proteínico de interés añadiendo una cantidad eficaz de un agente capaz de inhibir la actividad de beta-glucosidasa al caldo de fermentación antes, durante, o después de que se complete fermentación, recuperando el producto de interés del caldo de fermentación, y, opcionalmente, sometiendo el producto recuperado a otra purificación.

[0164] La descripción se refiere a un método para la producción de un producto proteínico esencialmente libre de actividad de beta-glucosidasa cultivando la célula bajo condiciones que permitan la expresión del producto, sometiendo el caldo de cultivo resultante a un tratamiento combinado de pH y temperatura para reducir la actividad de beta-glucosidasa sustancialmente, y recuperando el producto del caldo de cultivo. De forma alternativa, el tratamiento combinado de pH y temperatura se puede realizar en una preparación enzimática recuperada del caldo de cultivo. El tratamiento combinado de pH y de temperatura puede opcionalmente ser usado en combinación con un tratamiento con un inhibidor de beta-glucosidasa.

[0165] Conforme a esta descripción, es posible eliminar al menos 60%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 85%, todavía más preferiblemente al menos 95%, y de forma más preferible al menos 99% de

la actividad de beta-glucosidasa. La eliminación completa de actividad de beta-glucosidasa puede sobtenerse usando este método.

[0166] El tratamiento combinado de pH y temperatura es realizado preferiblemente a un pH en el intervalo de 9 a 10 y una temperatura en el intervalo de al menos 65°C para un periodo temporal suficiente para lograr el efecto deseado, donde típicamente, 10 a 30 minutos es suficiente.

[0167] Los métodos usados para el cultivo y la purificación del producto de interés se pueden realizar por métodos conocidos en la técnica.

[0168] Los métodos descritos para producir un producto esencialmente libre de beta-glucosidasa son de interés particular en la producción de polipéptidos eucarióticos, en particular, proteínas fúngicas tales como enzimas. La enzima puede ser seleccionada de, por ejemplo, una enzima amilolítica, enzima lipolítica, enzima proteolítica, enzima celulítica, oxidorreductasa, o enzima degradadora de la pared celular vegetal. Ejemplos de tales enzimas incluyen una aminopeptidasa, amilasa, amiloglucosidasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, esterasa, galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, glucosa oxidasa, glucosidasa, haloperoxidasa, hemicelulasa, invertasa, isomerasa, lacasa, ligasa, lipasa, liasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fitasa, fenoloxidase, polifenoloxidase, enzima proteolítica, ribonucleasa, transferasa, transglutaminasa o xilanasa. Las células deficitarias en beta-glucosidasas también puedenser usadas para expresar proteínas heterólogas de interés farmacéutico tales como hormonas, factores de crecimiento, receptores y similares.

[0169] Se entenderá que el término "polipéptidos eucariotas" incluye no sólo polipéptidos nativos, sino también aquellos polipéptidos, por ejemplo, enzimas, que han sido modificados por sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácido u otras modificaciones de este tipo para mejorar la actividad, la termoestabilidad, la tolerancia del pH y similares.

[0170] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto proteínico esencialmente libre de actividad de beta-glucosidasa que se produce por un método de la presente invención.

Composiciones

[0171] La descripción también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido aislado de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriqucidas en tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de beta-glucosidasa de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

[0172] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. De forma alternativa, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidase, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa.

[0173] La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por un microorganismo del género Aspergillus, preferiblemente *Aspergillus aculeatus, Aspergillus awamori, Aspergillus fumigatus, Aspergillus foetidus, Aspergillus japonicus, Aspergillus nidulans, Aspergillus niger,* o *Aspergillus oryzae; Fusarium,* preferiblemente *Fusarium bactridioides, Fusarium cerealis, Fusarium crookwellense, Fusarium culmorum, Fusarium graminearum, Fusarium graminum, Fusarium heterosporum, Fusarium negundi, Fusarium oxysporum, Fusarium reticulatum, Fusarium roseum, Fusarium sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sulphureum, Fusarium toruloseum, Fusarium trichothecioides,* o *Fusarium venenatum; Humicola,* preferably *Humicola insolens* or *Humicola lanuginosa;* o *Trichoderma,* preferiblemente *Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei,* o *Trichoderma viride*.

[0174] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido a ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0175] Más abajo se proporcioan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las cuales se usa la composición puede determinarse basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0176] La descripción también está dirigida a métodos para usar los polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa, o composiciones de las mismas, según se describe más abajo.

Degradación de biomasa a monosacáridos, disacáridos, y polisacáridos

[0177] La descripción también se refiere a métodos para degradar o convertir un material celulósico, que comprende: tratamiento del material celulósico con una cantidad eficaz de una o más proteínas celulolíticas en presencia de una cantidad eficaz de un polipéptido con actividad de beta-glucosidasa.

[0178] Los polipéptidos y las células huéspedes de la presente invención, como se describe en este caso, se pueden utilizar en la producción de monosacáridos, disacáridos,y polisacáridos como materias primas químicas o de fermentación de biomasa para la producción de etanol, plástico, otros productos o productos intermedios. Los polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa pueden ser en forma de un caldo de fermentación crudo con o sin las células quitadas o en forma de una preparación enzimática semi-purificada o purificada. La proteína de beta-glucosidasa puede también ser una preparación monocomponente, una preparación de proteína de varios componentes, o una combinación de preparaciones de proteína monocomponentes y de varios componentes. De manera alternativa, una célula huésped de la presente invención se puede utilizar como una fuente del polipéptido con actividad de beta-glucosidasa en un proceso de fermentación con la biomasa. La célula huésped también puede contener genes heterólogos o nativos que codifican proteína celulolítica al igual que otras enzimas útiles en el tratamiento de biomasa. En particular, los polipéptidos y las células huéspedes de la presente invención se pueden utilizar para aumentar el valor de residuos de tratamiento (grano secos de destiladores, afrecho de elaboración de cerveza, bagazo de caña de azúcar, etc.) por degradación completa o parcial de celulosa o hemicelulosa.

[0179] La biomasa puede incluir, de modo enunciativo y no limitativo, recursos de madera, desperdicios municipales sólidos, papel usado y residuos de cosecha (véase, por ejemplo, Wiselogel et al., 1995, en Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), páginas 105- 118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16 ; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719 ; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23- 40, Springer-Verlag, New York).

[0180] El polisacárido predominante en la pared celular primaria de la biomasa es la celulosa, el segundo más abundante es la hemicelulosa y el tercero es la pectina. La pared celular secundaria, producida después de que la célula ha dejado de crecer, también contiene polisacáridos y se refuerza a través de lignina polimérica reticulada de manera covalente a la hemicelulosa. La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y, de ese modo, es un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras que las hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanos y mananos en estructuras ramificadas complejas con un espectro de sustituyentes. Aunque en general se encuentra celulosa polimorfa en el tejido vegetal principalmente como una matriz cristalina insoluble de cadenas paralelas de glucano. Las hemicelulosas normalmente tienen enlace de hidrógeno a celulosa, al igual que a otras hemicelulosas, lo cual ayuda a estabilizar la matriz de la pared celular.

[0181] En los métodos de la presente invención, la proteína celulolítica puede ser cualquier proteína implicada en el tratamiento de material celulósico a glucosa, o material hemicelulósico a xilosa, manosa, galactosa, y arabinosa, sus polímeros, o productos derivados de los mismos como se describe más abajo. Como se ha mencionado anteriormente, una célula huésped de la presente invención se puede utilizar como una fuente del polipéptido con beta-glucosidasa y como una fuente de proteína celulolítica heteróloga o nativa al igual que otras enzimas útiles en el tratamiento de la biomasa. La proteína celulolítica también puede ser una preparación monocomponente, por ejemplo, una celulasa, una preparación de varios componentes, por ejemplo, endoglucanasa, celobiohidrolasa, o una combinación de preparaciones de proteína monocomponentes y de varios componentes. Las proteínas celulolíticas puede tener actividad, es decir, hidrolizar celulosa, en el intervalo de pH ácido, neutro, o alcalino.

[0182] La proteína celulolítica puede ser de origen bacteriano o fúngico, que se puede obtener o aislar y purificar de microorganismos que son conocidos por ser capaces de producir enzimas celulolíticas, por ejemplo, especies de *Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Coprinus, Thielavia, Fusarium, Myceliophthora, Acremonium, Cephalosporium, Scytalidium, Penicillium* or *Aspergillus* (see, for example, EP 458162), especially those produced by a strain selected from the species*Humicola insolens* (reclassified as *Scytalidium thermophilum,*véae,por ejemplo, Patente estadounidense n.º 4.435.307), *Coprinus cinereus, Fusarium oxysporum, Myceliophthora thermophila, Meripilus giganteus, Thielavia terrestris, Acremonium* sp.,*Acremonium persicinum, Acremonium acremonium, Acremonium brachypenium, Acremonium dichromosporum, Acremonium obclavatum, Acremonium pinkertoniae, Acremonium roseogriseum, Acremonium incoloratum y Acremonium furatum;* preferiblemente de la especie *Humicola insolens* DSM 1800, *Fusarium oxysporum* DSM 2672, *Myceliophthora thermophila* CBS 117.65, *Cephalosporium* sp. RYM-202, *Acremonium* sp. CBS 478.94, *Acremonium* sp. CBS 265.95, *Acremonium persicinum* CBS 169.65, *Acremonium acremonium* AHU 9519, *Cephalosporium* sp. CBS 535.71, *Acremonium brachypenium* CBS 866.73, *Acremonium dichromosporum* CBS 683.73, *Acremonium obclavatum* CBS 311.74, *Acremonium pinkertoniae* CBS 157.70, *Acremonium roseogriseum* CBS 134.56, *Acremonium incoloratum* CBS 146.62 y *Acremonium furatum* CBS 299.70H. Las proteínas celulóticas también pueden obtenerse a partir de *Trichoderma* (particularmente *Trichoderma viride, Trichoderma reesei* y *Trichoderma koningii),* alkalophilic *Bacillus* (véase,por ejemplo, la Patente estadounidense n.º 3.844.890 y EP 458162), y *Streptomyces* (véase, por ejemplo, EP 458162). Están incluidos mutantes creados genéticamente o modificados químicamente de proteínas.

[0183] Proteínas celulolíticas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 495.257 , EP 531.372 , WO 96/11262, WO 96/29397 , WO 98/08940. Otros ejemplos son las variantes de celulasas tales como las descritas en WO 94/07998, EP 531,315, Patente estadounidense n.º 4.435.307 , Patente estadounidense n.º 5.457.046, Patente estadounidense n.º 5.5.648.263, Patente estadounidense

n.º 5.686.593 Patente estadounidense n.º 5.691,178 , Patente estadounidense n.º 5.763.254 , Patente estadounidense n.º 5.776.757 , WO 89/09259 , WO 95/24471 , WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0184] Las proteínas celulolíticas usado en los métodos de la presente invención se pueden producir por fermentación de las cepas microbianas mencionadas anteriormente en un medio nutritivo con fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas adecuadas, usando procedimientos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bennett, J.W. y LaSure, L. (eds.), More Gene Manipulations in Fungi, Academic Press, CA, 1991). Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según

composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Los rangos de temperatura y otras condiciones adecuadas para el crecimiento y la producción de proteína celulolítica se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Bailey, J.E., y Ollis, D.F., Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill Book Company, NY, 1986).

[0185] La fermentación puede ser cualquier método de cultivo de una célula que de como resultado la expresión o el aislamiento de una proteína celulolítica. Puede entenderse, por lo tanto, que la fermentación comprende cultivo en matraz de agitación y fermentación en pequeña escala o gran escala (incluidas fermentaciones continuas, de lote, en flujo discontinuo, o fermentaciones en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido sea expresado y/o aislado.

[0186] Las proteínas celulolíticas resultantes producidas por los métodos anteriormente descritos pueden ser recuperadas del medio de fermentación por procedimientos convencionales incluidos, entre otros, centrifugado, filtración, secado por pulverización, evaporación, o precipitación. La proteína recuperada luego puede ser purificada aún más por una variedad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad o similar.

[0187] La proteína celulolítica puede hidrolizar o hidroliza carboximetilcelulosa (CMC), disminuyendo así la viscosidad de la mezcla de incubación. La reducción resultante en la viscosidad se puede determinar por un viscosímetro por vibración (p. ej., MIVI 3000 de Sofraser, Francia). La determinación de la actividad de celulasa, medido en cuanto a unidad de viscosidad de celulasa (CEVU), cuantifica la cantidad de actividad catalítica presente en una muestra midiendo la capacidad de la muestra para reducir la viscosidad de una solución de carboximetilcelulosa (CMC). El ensayo se realiza a la temperatura y pH adecuados para la proteína celulolítica y el sustrato. Para Celluclast™ à (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) el ensayo se realiza a 40°C en 0.1 M tampón fosfato pH 9,0 durante 30 minutos con CMC como sustrato (33,3 g/L carboximetilcelulosa Hércules 7 LFD) y una concentración enzimática de aproximadamente 3,3-4,2 CEVU/ml. La actividad de CEVU se calcula en relación a un estándar de enzima declarada, tal como Estándar de CELLUZYME™ 17-1194 (obtenido de Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca).

[0188] Ejemplos de preparaciones celulolíticas adecuadas para el uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, CELLUCLAST™ (disponible de Novozymes A/S) y NOVOZYM™ 188 (disponible de Novozymes A/S). Otras preparaciones disponibles comercialmente que comprenden celulasa que se puede usar incluyen CELLUZYME™, CEREFLO™ y ULTRAFLO™ (Novozymes A/S), LAMINEX™ y SPEZYME™ CP (Genencor Int.) y ROHAMENT™ 7069 W (Röhm GmbH). Las enzimas de celulasa se agregan en cantidades eficaces de aproximadamente 0,001% a alrededor de 5,0% peso de sólidos, más preferiblemente de aproximadamente 0,025% a alrededor de 4.0% peso de sólidos, y de forma más preferible de aproximadamente 0,005% a alrededor de 2,0% peso de sólidos.

[0189] Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas celulolíticas usadas en los métodos de la presente invención pueden ser preparaciones monocomponentes, es decir, un componente esencialmente libre de otros componentes celulolíticos. El componente único puede ser un componente recombinante, es decir, producido por clonación de una secuencia de ADN que codifica el único componente y célula posterior transformada con la secuencia de ADN y expresada en un huésped (véase, por ejemplo, WO 91/17243 y WO 91/17244). Otros ejemplos de proteínas celulolíticas de monocomponente incluyen, de modo enunciativo y no limitativo, aquellas descritas en JP 07203960-A y WO-9206209. El huésped es preferiblemente un huésped heterólogo (la enzima es extranjera al huésped), pero el huésped puede, bajo ciertas condiciones, también ser un huésped homólogo (la enzima es nativa al huésped.). Las proteínas celulolíticas monocomponentes también pueden ser preparadas por purificación de tal proteína de un caldo de fermentación.

[0190] Ejemplos de proteínas celulolíticas monocomponentes útiles en la práctica de los métodos de la presente invención incluyen, de forma no limitativa, endoglucanasa, celobiohidrolasa, y otras enzimas útiles en la degradación de biomasa celulósica.

[0191] El término "endoglucanasa" es definido en la presente como una endo-1,4-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. N°. 3,2,1,4) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en celulosa, derivados de celulosa (tales como carboximetilcelulosa e hidroxietil celulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mezclados tales como beta-D-glucanos de cereales o xiloglucanos y otra materia vegetal que contiene componentes celulósicos. Para fines de la presente invención, la actividad endoglucanasa es determinada utilizando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268. Una unidad de actividad endoglucanasa es definida como 1,0 µmol de azúcares reducidos producidos por minuto a 50 ºC, pH 4,8.

[0192] El término "celobiohidrolasa" es definido en la presente como un 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (E.C. 3,2,1,91), que cataliza la hidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, celooligosacáridos o cualquier

glucosa beta-1,4-enlazada que contenga polímero, liberando celobiosa de las extremidades reductoras o o reductoras de la cadena. Para fines de la presente invención, la actividad de celobiohidrolasa se determina según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972; Anal. Biochem. 47: 273-279 y por van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156 ; van Tilbeurgh and Claeyssens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288.

[0193] Los polipéptidos de la presente invención se usan conjuntamente con proteínas celulolíticas para degradar los componentes hemicelulósicos y/o celulósicos del sustrato de biomasa a azúcares, como se ha mencionado anteriormente (véase, por ejemplo, Brigham et al., 1995, in Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp.119-141, Taylor & Francis, Washington.D.C.; Lee.1997, Journal of Biotechnology 56: 1-24). Los métodos de la presente divulgación puede además comprender la recuperación del material celulósico degradado, usando métodos convencionales en la técnica.

[0194] Las cantidades óptimas de un polipéptido con actividad de beta-glucosidasa y de proteínas celulolíticas depende de diferentes factores incluidos, entre otros, la mezcla de proteínas celulolíticas del componente, el sustrato celulósico, la concentración de sustrato celulósico, el/los pretratamiento(s) del sustrato celulósico, temperatura, tiempo, pH e inclusión de organismo de fermentación (p. ej., levadura para sacarificación y fermentación simultáneas). El término "proteínas celulolítica" es definido en la presente como aquellas proteínas o mezclas de proteínas que demuestran ser capaces de hidrolización o conversión o degradación de celulosa bajo las condiciones evaluadas. Sus cantidades son normalmente medidas por un ensayo común tal como BCA (bicinchoninic acid, P.K. Smith et al., 1985, Anal. Biochem. 150: 76) y la cantidad preferida agregada en proporción a la cantidad de biomasa que se está hidrolizando.

[0195] En un aspecto preferido, la cantidad de polipéptido con actividad de beta-glucosidasa por g de material celulósico es aproximadamente 0,01 a alrededor de 2,0 mg, preferiblemente aproximadamente 0,025 a alrededor de 1,5 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,05 a alrededor de 1,25 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,075 a alrededor de 1,25 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,1 a alrededor de 1,25 mg, incluso más preferiblemente aproximadamente 0,15 a alrededor de 1,25 mg, y de forma más preferible aproximadamente 0,25 a alrededor de 1,0 mg por g de material celulósico.

[0196] En otro aspecto preferido, la cantidad de proteínas celulolíticas por g de material celulósico es aproximadamente 0,5 a alrededor de 50 mg, preferiblemente aproximadamente 0,5 a alrededor de 40 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,5 a alrededor de 25 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,75 a alrededor de 20 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,75 a alrededor de 15 mg, incluso más preferiblemente aproximadamente 0,5 a alrededor de 10 mg, y de forma más preferible aproximadamente 2,5 a alrededor de 10 mg por g de material celulósico.

[0197] Los métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para procesar un material celulósico a muchas sustancias útiles, por ejemplo, productos orgánicos, productos químicos y combustibles. Además de etanol, algunos productos químicos de consumo y de especialidad que se pueden producir a partir de celulosa incluyen xilosa, acetona, acetato, glicina, lisina, ácidos orgánicos (p. ej., ácido láctico), 1,3-propanediol, butanodiol, glicerol, etilenglicol, furfúrico, polihidroxialcanoatos, cis, ácido cis-mucónico, y pienso para animales (Lynd, L. R., Wyman, C. E., and Gerngross, T. U., 1999, Biocommodity Engineering, Biotechnol. Prog., 15: 777-793 ; Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethano/: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212 ; and Ryu, D. D. Y., and Mandels, M., 1980, Cellulases: biosynthesis and applications, Enz Microb. Technol., 2: 91-102). Los beneficios de coproducción potenciales se extienden más allá de la síntesis de múltiples productos orgánicos de carbohidrato fermentable. Los residuos ricos en lignina restantes después del tratamiento biológico se pueden convertir en productos químicos derivados de lignina o pueden ser usados para la producción de potencia.

[0198] Los métodos convencionales usados para procesar el material celulósico conforme a los métodos de la presente divulgación son bien entendidos por los expertos en la técnica. Los métodos de la presente divulgación pueden ser implementados usando cualquier aparato de tratamiento de biomasa convencional configurado para funcionar conforme a la invención.

[0199] Tal aparato puede incluir un reactor por lotes con agitación, un reactor de flujo continuo con agitación con ultrafiltración, un reactor de de flujo de tapón de columna continua (Gusakov, A. V., and Sinitsyn, A. P., 1985, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of cellulose: 1. A mathematical model for a batch reactor process, Enz. Microb. Technol. 7: 346-352), un reactor de reducción (Ryu, S. K. y Lee, J. M., 1983, Bioconversion of waste cellulose by using an attrition bioreactor, Biotechnol. Bioeng. 25: Bioeng. 53-65), o un reactor con agitación intensiva inducida por un campo electromagnético (Gusakov, A. V., Sinitsyn, A. P., Davydkin, I. Y., Davydkin, V. Y., Protas, O. V., 1996, Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field, Appl. Biochem. Biotechnol. 56: 141-153).

[0200] Los métodos convencionales incluyen, entre otros, sacarificación, fermentación, hidrólisisy fermentación separadas (SHF), sacarificación simultánea y fermentación (SSF) sacarificación y cofermentación simultáneas (SSCF), hidrólisis y fermentación híbridas (HHF) y conversión directa microbiana (DMC).

[0201] SHF utiliza pasos de proceso separados para primero hidrolizar enzimáticamente celulosa a glucosa y luego fermentar glucosa a etanol. En SSF, la hidrólisis enzimática de celulosa y la fermentación de glucosa a etanol se combinan en un paso (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212). SSCF incluye la cofermentación de azúcares múltiples (Sheehan, J., and Himmel, M., 1999, Enzymes, energy and the environment: A

strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and development activities for bioethanol, Biotechnol. Prog. 15: 817-827). HHF incluye dos pasos separados realizados en el mismo reactor pero a temperaturas diferentes, es decir, sacarificación enzimática a alta temperatura seguida de SSF a una temperatura inferior que la cepa de fermentación puede tolerar. DMC combina los tres procesos (producción de celulasa, hidrólisis de celulosa, y fermentación) en un paso (Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., and Pretorius, I. S., 2002, Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology, Microbiol. Mol. Biol. Reviews 66: 506-577).

[0202] La "fermentación" o el “proceso de fermentación” se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprenda un paso de fermentación. Un proceso de fermentación incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir productos de fermentación, incluidos alcoholes (p. ej., arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanediol, sorbitol y xilitol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina y treonina); gases (p. ej., metano, hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2) y monóxido de carbono (CO)). Los procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación usados en la industria de alcohol consumible (p. ej., cerveza y vino), industria lechera (p. ej., productos lácteos fermentados), industria de cuero e industria de tabaco.

[0203] La descripción además se refiere a métodos para producir una sustancia, que comprende: (a) sacarificación de un material celulósico con una cantidad eficaz de una proteínas celulolítica o más en presencia de una cantidad eficaz de un polipéptido con actividad de beta-glucosidasa; (b) fermentación del material celulósico sacarificado del paso (a) con uno o más microorganismos fermentativos; y (c) recuperación de la sustancia de la fermentación. El polipéptido con actividad de beta-glucosidasa puede ser en forma de un caldo de fermentación crudo con o sin las células o en forma de una preparación enzimática semi-purificada o purificada. La proteína de beta-glucosidasa puede ser una preparación monocomponente, una preparación de proteína de varios componentes, o una combinación de preparaciones de proteína monocomponentes y de varios componentes.

[0204] La sustancia puede ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. La sustancia puede ser un alcohol. Se entenderá que el término "alcohol" comprende una sustancia que contiene una o más fracciones de hidróxilo. En un aspecto preferido, el alcohol es arabinitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es butanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es etanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es glicerol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es metanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es 1,3-propanediol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es sorbitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es xilitol. Véase,por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241 ; Silveira, M. M., and Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 400-408 ; Nigam, P., and Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, Process Biochemistry 30 (2): 117-124 ; Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by Clostridium beijerinckii BA101 and in situ recovery by gas stripping, World Journal of Microbiology and Biotechnology 19 (6): 595-603.

[0205] La sustancia puede ser un ácido orgánico. El ácido orgánico puede ser ácido acético. El ácido orgánico puede ser ácido acetónico. El ácido orgánico puede ser ácido adípico. El ácido orgánico puede ser ácido ascórbico. El ácido orgánico puede ser ácido cítrico. El ácido orgánico puede ser ácido 2,5-diceto-D-glucónico. El ácido orgánico puede ser ácido fórmico. El ácido orgánico puede ser ácido fumárico. El ácido orgánico puede ser ácido glucárico. El ácido orgánico puede ser ácido glucónico. El ácido orgánico puede ser ácido glucurónico. El ácido orgánico puede ser ácido glutárico. El ácido orgánico puede ser ácido hidroxipropiónico. El ácido orgánico puede ser ácido itacónico. El ácido orgánico puede ser ácido láctico. El ácido orgánico puede ser ácido málico. El ácido orgánico puede ser ácido malónico. El ácido orgánico puede ser ácido oxálico. El ácido orgánico puede ser ácido propiónico. El ácido orgánico puede ser ácido succínico. El ácido orgánico puede ser ácido xilónico. Vçease,por ejemplo, Chen, R., and Lee, Y. Y., 1997, Membrane- mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65:435- 448.

[0206] La sustancia puede ser una cetona. Se entenderá que el término "cetona" comprende una sustancia que contiene una o más fracciones de cetona. En otro aspecto más preferido, la cetona es acetona. Véase, por ejemplo, Qureshi y Blaschek, 2003, *supra*.

[0207] La sustancia puede ser un aminoácido. El ácido orgánico puede ser ácido aspártico. El aminoácido puede ser ácido glutámico. El aminoácido puede ser glicina. El aminoácido puede ser lisina. El aminoácido puede ser serina. El aminoácido puede ser treonina. Véase, por ejemplo, Richard, A., and Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, Biotechnology and Bioengineering 87 (4): 501-515.

[0208] La sustancia puede ser un gas. El gas puede ser metano. El gas puede ser H_2. El gas puede ser CO_2. El gas puede ser CO. Vease, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya, and K. Kiriyama, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, Water Science and Technology 36 (6-7): 41-47 ; and Gunaseelan V.N. in Biomass and Bioenergy, Vol. 13 (1-2), páginas 83-114, 1997 , Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.

[0209] La producción de una sustancia de material celulósico típicamente requiere cuatro pasos principales. Estos cuatro pasos son pretratamiento, hidrólisis enzimática, fermentación, y recuperación. Más abajo se ejemplifica un proceso para producir etanol, pero se entenderá que pueden utilizarse procesos similares para producir otras sustancias, por ejemplo, las sustancias descritas anteriormente.

[0210] Pretratamiento En el pretratamiento o paso prehidrólisis, el material celulósico se calienta para descomponer la lignina y estructura de carbohidrato, solubilizar la mayor parte de la hemicelulosa y hacer la fracción de celulosa accesible a enzimas celulolíticas. El calentamiento se realiza directamente con vapor o en suspensión donde un catalizador también puede ser agregado al material para acelerar las reacciones. Los catalizadores incluyen ácidos fuertes, tales como ácido sulfúrico y SO_2 o alcali, tal como hidróxido sódico. El propósito de la fase de pretratamiento es facilitar la penetración de las enzimas y los microorganismos. La biomasa celulósica también puede estar sujeta a un pretratamiento hidrotérmico de explosión a vapor (véase la solicitud de patente estadounidense n.° 20020164730).

[0211] Sacarificación En el paso de hidrólisis enzimática, también conocido como sacarificación, las enzimas, según se describen en este caso, se agregan al material pretratado para convertir la fracción de celulosa a glucosa y/u otros azúcares. La sacarificación generalmente es realizada en reactores de tanque agitado o fermentadores bajo pH ; temperatura y condiciones de mezcla controladas. Un paso de sacarificación puede durar hasta 200 horas. La sacarificación se puede realizar a temperaturas de aproximadamente 30 °C a alrededor de 65 °C, en particular alrededor de 50 °C, y a un intervalo de pH entre aproximadamente 4 y aproximadamente 5, especialmente alrededor de pH 4,5. Para producir glucosa pueda ser metabolizada por levadura, la hidrólisis es típicamente realizada en presencia de un polipéptido con actividad de beta-glucosidasa.

[0212] Fermentación En el paso de fermentación, los azúcares, librados del material celulósico como resultado de los pasos de pretratamiento e hidrólisis enzimática, se fermentan a etanol por un organismo fermentativo, tal como levadura. La fermentación también puede efectuarse simultáneamente con la hidrólisis enzimática en el mismo vaso, nuevamente bajo pH, temperatura y condiciones de mezcla controladas. Cuando las sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente en el mismo vaso, el proceso generalmente es denominado sacarificación y fermentación simultáneas o SSF.

[0213] Cualquier sustrato celulósico o materia prima adecuada se puede utilizar en un proceso de fermentación de la presente divulgación. El sustrato generalmente es seleccionado según el producto de fermentación deseada, es decir, la sustancia a ser obtenida de la fermentación, y el proceso empleado, como se conoce en la técnica. Ejemplos de sustratos adecuados para el uso en los métodos de la presente divulgación, incluyen materiales con celulosa, tal como madera o residuos de planta o azúcares de bajo peso molecular DP1-3obtenidos de material celulósico procesado que pueden ser metabolizados por el microorganismo fermentativo, y que pueden suministrarse por adición directa al medio de fermentación.

[0214] Se entenderá que el término "medio de fermentación" se refiere a un medio antes de agregar el/los microorganismo(s) fermentativo, por ejemplo, un medio producto de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

[0215] "Microorganismo fermentativo" se refiere a cualquier microorganismo adecuado para el uso en un proceso de fermentación deseada. Los microorganismos fermentativos adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convierter azúcares, tales como glucosa, xilosa, arabinosa, manosa, galactosa u oligosacáridos directa o indirectamente en el producto de fermentación deseada. Ejemplos de microorganismos fermentativos incluyen organismos fúngicos, tal como levadura. La levadura preferida incluye cepas del Saccharomyces spp., y en particular, Saccharomyces cerevisiae. La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, Red Star®/™/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, EEUU) FALI (disponible de levadura del Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EEUU), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponibles de DSM Specialties).

[0216] La levadura puede ser una *Saccharomyce spp.* La levadura puede ser *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura puede *Saccharomyces distaticus*. La levadura puede ser *Saccharomyces uvarum*. La levadura puede ser una *Kluyveromyces* spp. La levadura puede ser de *Kluyveromyces marxianus*. La levadura puede ser de *Kluyveromyces fragilis.* La levadura puede ser una *Candida* spp. La levadura puede ser *Candida pseudotropicalis.* La levadura puede ser de *Candida brassicae*. La levadura puede ser una *Clavispora* spp. La levadura puede ser *Clavispora lusitaniae.* La levadura puede ser *Clavispora opuntiae*. La levadura puede ser una *Pachysolen* spp. La levadura puede ser *Pachysolen tannophilus*. La levadura puede ser una *Bretannomyces* spp. La levadura puede ser *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, en Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

[0217] Las bacterias que puede fermentar eficazmente glucosa a etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, *supra*).

[0218] Se sabe en la técnica que los organismos anteriormente descritos también pueden ser usados para producir otras sustancias, como se describe en este caso.

[0219] La clonación de genes heterólogos en Saccharomyces *cerevisiae* (Chen, Z., Ho, N. W. Y., 1993, Cloning and improving the expression of Pichia stipitis xylose reductase gene in Saccharomyces cerevisiae, Appl. Biochem. Biotechnol. 39-40: 135-147 ; Ho, N. W. Y., Chen, Z, Brainard, A. P., 1998, Genetically engineered Saccharomyces yeast

capable of effectively cofermenting glucose and xylose, Appl. Environ. Microbiol. 64: Microbiol. 1852-1859), o en bacterias tal como as*Escherichia coli* (Beall, D. S., Ohta, K., Ingram, L. O., 1991, Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant Escherichia coli, Biotech. Bioeng. 38. 296-303), *Klebsiella oxytoca* (Ingram, L. O., Gomes, P. F., Lai, X., Moniruzzaman, M., Wood, B. E., Yomano, L. P., York, S. W., 1998, Metabolic engineering of bacteria for ethanol production, Biotechnol. Bioeng. 58: 204-214) y *Zymomonas mobilis* (Zhang, M., Eddy, C., Deanda, K., Finkelstein, M., and Picataggio, S., 1995, Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic Zymomonas mobilis, Science 267: 240-243 ; Deanda, K., Zhang, M., Eddy, C., and Picataggio, S., 1996, Development of an arabinose- fermenting Zymomonas mobilis strain by metabolic pathway engineering, Appl. Environ. Microbiol. 62: 4465-4470) ha conducido a la construcción de organismos capaces de convertir hexosas y pentosas a etanol (cofermentación).

[0220] Típicamente se añade levadura u otro microorganismo a la celulosa degradada o hidrolizado y la fermentación se desarrolla durante aproximadamente 24 a alrededor de 96 horas, por ejemplo, aproximadamente 35 a alrededor de 60 horas. La temperatura típicamente es entre aproximadamente 26 °C a alrededor de 40 °C, en particular a aproximadamente 32 °C, y a aproximadamente pH 3 a alrededor de pH 6, en particular alrededor de pH 4-5.

[0221] En un aspecto preferido, la levadura u otro microorganismo se aplica a la celulosa degradada o hidrolizado y la fermentación se desarrolla por aproximadamente 24 a alrededor de 96 horas, tal como típicamente 35-60 horas. En un aspecto preferido, la temperatura generalmente está entre aproximadamente 26 a alrededor de 40 °C, en particular aproximadamente 32 °C, y el pH generalmente es de aproximadamente pH 3 a alrededor de pH 6, preferiblemente alrededor de pH 4-5. La levadura u otro microorganismo es preferiblemente aplicado en cantidades de aproximadamente 10^5 a 10^{12}, preferiblemente de aproximadamente 10^7 a 10^{10}, especialmente aproximadamente recuento viable de $5x10^7$ por ml de caldo de fermentación. Durante una fase de producción de etanol, el recuento de células de levadura preferiblemente debería estar en el intervalo de aproximadamente 10^7 a 10^{10}, especialmente alrededor de aproximadamente 2 x 10^8. Puede obtenerse mayor orientación acerca del uso de la levadura para la fermentación en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Nottingham University Press, Reino Unido, 1999).

[0222] El proceso más usado en la técnica es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que la levadura y la enzima son agregados de manera conjunta.

[0223] Para la producción de etanol, después de la fermentación, la trituración se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido según el proceso de la invención puede ser utilizado como, por ejemplo, etanol de combustible; etanol potable, es decir, licores neutros potables o etanol industrial.

[0224] Se puede utilizar un estimulador de fermentación en combinación con cualquiera de los procesos enzimáticos descritos en la presente para mejorar aún más el proceso de fermentación, y, en particular, el rendimiento del microorganismo fermentativo, tales como la mejora del índice y el rendimiento de etanol. Un "estimulador de fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentativos, en particular, la levadura. Los estimuladores de fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, riboflavin, y vitaminas A, B, C, D y E. Véase, por ejemplo, Alfenore et al., Improving ethanol production and viability of Saccharomyces cerevisiae by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002). Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que puede siministrar nutrientes, por ejemplo, P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn y Cu.

[0225] Recuperación El alcohol es separado del material celulósico fermentado y purificado por métodos de

destilación convencionales. Puede obtenerse etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 vol.%, que se puede usar como, por ejemplo, etanol de combustible, etanol potable, es decir, licores neutros potables o etanol industrial.

[0226] Para otras sustancias, se puede usar cualquier método conocido en la técnica incluidos, entre otros, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, cromatoenfoque hidrofóbico y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoque preparatorio), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato amónico), SDS-PAGE, destilación o extracción.

[0227] En los métodos, la(s) proteína(s) celulolítica(s) y polipéptido(s) de beta-glucosidasa se puede suplementar por una o más actividades enzimáticas adicionales para mejorar la degradación del material celulósico. Enzimas adicionales preferidas son hemicelulasas, esterasas (p. ej., lipasas, fosfolipasas y/o cutinasas), proteasas, lacasas, peroxidasas o mezclas derivadas.

[0228] En los métodos, la enzima(s) adicional(es) pueden ser agregadas antes o durante la fermentación, incluso durante o después de la propagación del/de los microorganismo(s) fermentativo(s).

[0229] Las enzimas a las cuales se hace referencia en la presente pueden derivarse u obtenerse de cualquier origen adecuado, incluido el origen bacteriano, fúngico, de levadura o mamífero. El término "obtenido" significa en la presente que la enzima puede haber sido aisladas de un organismo que produce naturalmente la enzima como una enzima nativa. El término "obtenido" también significa en la presente que la enzima puede haber sido producida de manera

recombinante en un organismo huésped, donde la enzima producida de manera recombinante es extranjera o bien nativa al organismo huésped o tiene una secuencia de aminoácidos modificada, por ejemplo, teniendo uno o más aminoácidos que son eliminados, insertados y/o sustituidos, es decir, una enzima producida de manera recombinante que es un mutante y/o un fragmento de una secuencia de aminoácidos nativa o una enzima producida por procesos de redistribución de ácido nucleico conocidos la técnica. Incluidas en el significado de una enzima nativa están las variantes naturales y dentro del significado de una enzima extranjera están las variantes obtenidas de manera recombinante, tal como por mutagénesis dirigida o redistribución.

[0230] Las enzimas también puede ser purificadas. El término "purificado" según se utiliza en este caso comprende enzimas libres de otros componentes del organismo del cual se derivan. El término "purificado" tambiénn comprende enzimas libres de componentes del organismo nativo del cual se obtienen. Las enzimas pueden ser purificadas, sólo con cantidades menores de otras proteínas que estén presentes. La expresión "otras proteínas" se relacionan en particular con otras enzimas. El término "purificado" según se utiliza en este caso también se refiere a la eliminación de otros componentes, particularmente otras proteínas y más particularmente otras enzimas presentes en la célula de origen de la enzima de la invención. La enzima puede ser "substancialmente pura", es decir, libre de otros componentes del organismo en el que es producida, es decir, por ejemplo, un organismo huésped para enzimas producidas de manera recombinante. En un aspecto preferido, las enzimas son al menos 75% (p/p), preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 96%, más preferiblemente al menos 97%, incluso más preferiblemente al menos 98%, o de la forma más preferible al menos 99% puras. En otro aspecto preferido, la enzima es 100% pura.

[0231] Las enzimas puede ser en cualquier forma adecuada para el uso en los procesos descritos en la presente, tal como, por ejemplo, un caldo de fermentación crudo con o sin células, un polvo seco o granulado, un granulado no polvoriento, un líquido, un líquido estabilizado o una enzima protegida. Los granulados pueden ser producidos, por ejemplo, como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs 4.106.991 y 4.661.452, y puede opcionalmente ser revestidos por procesos conocidos en la técnica. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo estabilizadores tal como un azúcar, un alcohol de azúcar u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico según proceso establecido. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el proceso descrito en EP 238.216.

Composiciones detergentes

[0232] Los polipéptidos aislados con actividad de beta-glucosidasa de la presente invención pueden ser añadidos a la composición detergente y así convertirse en un componente de la misma.

[0233] La composición detergente de la presente invención puede, por ejemplo, ser formulada como una composición detergente de lavado a mano o a máquina incluida una composición de aditivo de lavado adecuada para el tratamiento previo de tejidos manchados y una composición de suavizante agregado al enjuague, o ser formulada como una composición detergente para el uso en operaciones de limpieza de superficies duras del hogar en general, o ser formulada para operaciones de lavado de vajilla a mano o máquina.

[0234] La divulgación proporciona un aditivo detergente que comprende un polipéptido que tiene actividad de glucosidasa de la resente invención. El aditivo detergente, al igual que la composición detergente, puede comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, lipasa, cutinasa, una amilasa, carbohidrasa, celulasa, pectinasa, mananasa, arabinasa, galactanasa, xilanasa, oxidasa, por ejemplo, una lacasa y/o peroxidasa.

[0235] En general, las propiedades de la/s enzima/s elegida/s deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la/s enzima/s) debería/n estar presente/s en cantidades eficaces.

[0236] Proteasas: Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Están incluidos mutantes creados genéticamente o modificados químicamente de proteínas. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa alcalina microbiana o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son subtilisinas, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carisberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0237] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

[0238]Las enzimas proteásicas preferidas disponibles comercialmente incluyen Alcalase ™ Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™ y Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect OxP™, FN2™ y FN3™ (Genencor International Inc.).

[0239] Lipasas: lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen fúngico o bacteriano. Están incluidos mutantes creados genéticamente o modificados químicamente de proteínas. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo, *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) según se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* según se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o

P. pseudoalcaligenes (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331376); *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens, Pseudomonas sp*, cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtills* (Dartois *et al*., 1993, Biochemica et Biophysica Acta, 1131:: 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

[0240] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

[0241] Las enzimas de lipasa disponible comercialmente preferidas incluyen Lipolase™, Lipex™ y Lipolase Ultra™ (Novozymes A/S).

[0242] Amilasas: Las amilasas adecuadas (alpha y/o beta) incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Están incluidos mutantes creados genéticamente o modificados químicamente de proteínas. Las amilasas incluyen, por ejemplo, α-amilasas obtenidas de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *Bacillus licheniformis*, descrita en más detalle en GB 1.296.839.

[0243] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

[0244] Las amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novo Nordisk A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

[0245] Celulasas: las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Están incluidos mutantes creados genéticamente o modificados químicamente de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium* o *Trichoderma* , por ejemplo, las celulosas fúngicas producidas a partir de *Humicola Insolens, Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en la patente estadounidense n.º 4.435.307, la patente estadounidense n.º 5.648.263, la patente estadounidense n.º 5.691.178 , la patente estadounidense n.º 5.776.757 y WO 89/09259.

[0246] Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios de cuidados del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 495.257 , EP 531.372 , WO 96/11262, WO 96/29397 , WO 98/08940. Ejemplos de tales celulasas son celulasas como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, la patente estadounidense n.º 5.457.046, la patente estadounidense n.º 5.686.593, la patente estadounidense n.º 5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

[0247] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluclast®, Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0248] Peroxidasas/oxidasas: las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Están incluidos mutantes creados genéticamente o modificados químicamente de proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus* y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

[0249] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novo Nordisk A/S).

[0250] La/s enzima/s detergente/s se puede/n incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contengan una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado, por ejemplo, como un granulado, un líquido, un compuesto acuoso, etc. Las formulaciones de aditivo detergente preferidas son granulados, en particular granulados no pulverizados, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lodos.

[0251] Los granulados no pulverizados pueden ser producidos, por ejemplo, como se describe en las patentes estadounidenses n.os 4.106.991 y 4.661.452 y pueden ser revestidos opcionalmente por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de revestimiento ceroso son productos de poli(etileno óxido) (polietilenglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20.000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes etoxilados grasos en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono- y di-y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de revestimiento que forman películas adecuadas para la aplicación por técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden, por ejemplo, ser estabilizadas añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según los métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238.216.

[0252] La composición detergente de la invención puede ser en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una pastilla, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente con 70% de agua y 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.

[0253] La composición detergente comprende uno o más agentes tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluidos semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos. Los agentes tensioactivos están típicamente presentes a un nivel de 0,1% a 60% en peso.

[0254] Cuando se incluye en el mismo, el detergente normalmente contiene de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un tensioactivo aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato alcohólico, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido alfa-sulfo graso, ácido alquil o alquenilsuccínico, o jabón.

[0255] Cuando se incluye en el mismo, el detergente normalmente contiene de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un tensioactivo no iónico como alcohol etoxilato, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, polihidroxi alquil amida de ácido graso, o derivados N-acilo N-alquilo de glucosamina ("glugamidas").

[0256] El detergente puede contener 0-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilenodiaminatetraacético, ácido dietilenotriaminopentaacético, ácido alquil o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst).

[0257] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli (etilenglicol), alcohol polivinílico), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico, y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

[0258] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H_2O_2 tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador blanqueante de formación de perácido tal como tetraacetiletilenodiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. De forma alternativa, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de, por ejemplo, tipo amida, imida, o sulfona.

[0259] La/s enzima/s de la composición detergente de la invención puede/n ser estabilizada/s usando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenoglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilo borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico y la composición puede ser formulada como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708.

[0260] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como, por ejemplo, acondicionadores de tejido incluyendo arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes de anti redeposición de suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótropos, inhibidores de decoloración o perfumes.

[0261] En las composiciones detergentes, cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, se puede adicionar en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

[0262] La enzima de la invención puede adicionalmente ser incorporada en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202.

Otros usos

[0263] Los polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa de la presente invención también pueden ser usados en combinación con otras glicohidrolasas y enzimas relacionadas, según se describe en la presente, en el tratamiento de tejidos como agentes de biopulido y para reducción de pelusa, frisado, modificación de textura y lavado a la piedra (N.K. Lange, en P. Suominen, T. Reinikainen (Eds.), Trichoderma reesei Cellulases and Other Hydrolases, Foundation for Biotechnical and Industrial Fermentation Research, Helsinki, 1993, páginas 263-272). Además, os polipéptidos descritos también pueden ser usados en combinación con otras glicohidrolasas y enzimas relacionadas, según se describe en la presente, en el tratamiento de la madera para biorreducción a pasta o descortezado, fabricación de papel para modificación de fibra, blanqueamiento y reducción costes de energía de refinación, tratamiento de aguas blancas, importante para reciclaje de aguas residuales, reciclaje de fibra lignocelulósica tal como desentintado y tratamiento de fibras secundarias y utilización de residuos de madera (S.D, Mansfield y A.R. Esteghlalian en S.D, Mansfield y J.N. Saddler (Eds.), Applications of Enzymes to Lignocellulosics, ACS Symposium Series 855, Washington, D.C., 2003, páginas 2-29).

[0264] La presente invención es descrita adicionalmente por los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención.

Ejemplos

Materiales

[0265] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Secuenciación del ADN

[0266] La secuenciación del ADN fue realizada en un analizador genético Applied Biosystems Model 3130X (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) usando química de terminador colorante (Giesecke *et al*., 1992, Journal of Virol. Methods 38: 47- 60). Las secuencias fueron ensambladas con el uso de phred/phrap/consed (University of Washington, Seattle WA, EE. UU.) con cebadores específicos de secuencia.

Cepas

[0267] Se utilizó la cepa *Penicillium brasilianum* IBT 20888 (IBT Culture Collection of Fungi, Technical University of Denmark, Copenhagen, Dinamarca) como la fuente de beta-glucosidasa. Se utilizó *Aspergillus oryzae* BECH2 (WO 00/30322) para la expresión de beta-glucosidasa *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888

Medios y soluciones

TE fue compuesto por 10 mM Tris-1 mM EDTA.

El medio LB fue compuesto por litro de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro sódico.

Las placas LB fueron compuestas por litro de 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de cloruro sódico y 15 g de Bacto Agar.

STC fue compuesto por 1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl y 10 mM $CaCl_2$, pH 7,5.

La solución de PEG fue compuesta por 60% PEG 4000, 10 mM Tris-HCl y 10 mM $CaCl_2$, pH 7,5.

El medio de YPM fue compuesto por litro de 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 2% maltosa.

Ejemplo 1: Aislamiento de ADN genómico de *Penicillium brasilianum*

[0269] Las sporas de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888 fueron propagadas en arroz según Carlsen, 1994, Ph.D. thesis, Department of Biotechnology, The Technical University of Denmark. Las esporas fueron recuperadas con 20 ml de 0,1% Tween 20 y inoculadas a una concentración de $1x10^6$ esporas por ml en 100 ml de medio Mandels y Weben (Mandels y Weben, 1969, Adv. Chem. Ser. 95: 394-414) con glucosa al 1% suplementada por litro con 0,25 g de extracto de levadura y 0,75 g de bactopeptona en un matraz vibrante disipado de500 ml. Los micelios fúngicos fueron cosechados después 24 horas de crecimiento aeróbico a 30 °C, 150 r.p.m.

[0270] Los micelios fueron recogidos por filtración a través de un filtro Nalgene DS0281-5000 (Nalge Nunc International Corporation, Rochester, EEUU) hasta la sequedad y congelados en nitrógeno líquido. Los micelios congelados fueron molidos a polvo en un mortero enfriado con hielo seco y distribuido a un tubo con tapón de rosca. El polvo fue suspendido en un volumen total de 40 ml de 50 mM de ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanesulfónico (CAPS)-NaOH pH 11 tampón con 0,5% de litio dodecil sulfato y 0,5 mM de EDTA. La suspensión fue colocada a 60 °C durante 2 horas y periódicamente resuspendida por inversión. A la suspensión se añadió un volumen igual de fenol-cloroformo (1:1 V/V) neutralizado con 0.1 M deTris base y el tubo fue mezclado en una rueda giratoria a 37 °C durante 2 horas. Después del centrifugado a 2500 r.p.m. durante 10 minutos en un rotor Sorvall H1000B, la fase acuosa (fase superior) fue reextraída otra vez con fenol-cloroformo (1:1 V/V) y centrifugada a 15.000 x g durante 5 minutos. La fase acuosa de la segunda extracción fue llevada a 2.5 M de acetato amónico (materia prima 10 M) y colocada a -20°C hasta que se congele. Después de la descongelación, el extracto fue centrifugado a 15.000 x g durante 20 minutos en un rotor frío. El granulado (principalmente ARNr) fue desechado y los ácidos nucleicos en el sobrenadante fueron precipitados por adición de 0.7 volúmenes de isopropanol. Después del centrifugado a 15.000 x g durante 15 minutos, el granulado fue enjuagado tres veces con 5 ml de etanol al 70% (sin resuspensión), secado por aire casi completamente y disuelto en 1,0 ml de 0,1X TE. El granulado disuelto fue transferido a dos tubos 1.5 ml de microcentrífuga. La solución de granulado fue precipitada por adición de acetato amónico (0,125 ml) a 2,0 M y etanol al 63% (1,07 ml) y centrifugada a velocidad máxima durante 10 minutos en un microcentrifugadora Sorvall MC 12V (Kendro Laboratory Products, Asheville, NC, EE. UU.). El granulado fue enjuagado dos veces con etanol al 70%, secado por aire completamente, y disuelto en 500 µl de 0,1X TE.

Ejemplo 2: Preparación de una biblioteca de ADN genómico

[0271] Las bibliotecas genómicas fueron construidas usando un equipo de subclonación de secuenciación aleatoria TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Brevemente, el ADN celular total fue cortado por pulverización bajo 10 psi de nitrógeno durante 15 segundos y dividido por tamaño en geles al 1% de agarosa usando 40 mM tampón de Tris base-20 mM sodio acetato-1 mM disodio de EDTA (TAE). Los fragmentos de ADN que migraron en el intervalo de tamaño 3-6 kb fueron cortados y eluidos usando un equipo de extracción de gel de MiniElute™ (QIAGEN Inc, Valencia, CA, EE. UU.). Los fragmentos eluidos fueron divididos por tamaño nuevamente usando un gel de agarosa al 1% como en el caso anterior y los fragmentos de ADN que migraron en el intervalo de tamaño 3-6 kb fueron cortados y eluidos usando un equipo de extracción de gel de MiniElute™.

[0272] Los fragmentos de ADN eluidos fueron reparados y defosforilado en los extremos romos usando fosfatasa alcalina de gamba (Roche Applied Science, Manheim, Alemania). Los fragmentos de ADN de extremo romo fueron clonados en un Vector pCR4Blunt- TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante, fueron transformados en células electrocompetentes de *E. coli* TOP10 por electroporación, y colocados en placas en placas LB suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. La electroporación tuvo como resultado 15.300 clones.

Ejemplo 3: Purificación de beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum*

[0273] La cepa IBT 20888 de *Penicillium brasilianum* fue cultivada en 4 litros de medio de Mandels y Weber (Mandels and Weber, 1969, *supra*) en un 1 biorreactor de 5 litros suplementado por litro con 1 g de extracto de levadura, 3 g de bactopeptona, 30 g de celulosa y 10 g de xilano. Las esporas fueron propagadas en arroz según Carlsen, 1994, *supra*. El biorreactor fue inoculado a una concentración de $1x10^6$ esporas por ml. El pH fue mantenido a 5,0 por adición de 2 M NH_4 OH o 2 M HCl. La temperatura se mantuvo a 30 °C. La aireación fue 4 litros por minuto y 300-500 rpm. Después 111 horas, el cultivo fue terminado y el caldo fue filtrado a través de un filtro de fibra de vidrio (GD 120, Advantec, Japón).

[0274] La actividad de la beta-glucosidasa fue medida a temperatura ambiente en 50 mM de citrato sódico pH 4.8. El sustrato fue 1 mM de 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranósido en 50 mM de citrato sódico pH 4,8. La beta-glucosidasa hidroliza el enlace aglucónico entre 4-nitrofenol y la glucosa. El 4-nitrofenol liberado es amarillo en solución alcalina y se puede determinar espectrofotométricamente a 405 nm. Un unidad internacional de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que libera 1 µmol de 4-nitrofenol por minuto a pH 4,8, 25 °C.

[0275] La concentración de proteína fue determinada por medio de SDS-PAGE. Se añadieron quince µl de muestra a 15 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE (1.17 M sacarosa, 1 M Tris HCl, pH 8,5, 278 mM SDS, 2,05 mM EDTA, 0,88 mM Brilliant Blue G, y 0,2 M ditiotreitol) en un tubo de Eppendorf y se calentaron a 70 °C durante 10 minutos. A continuación, se aplicó calentamiento de la muestra diluida a un pre-cast gel Bis-Tris al 4-12 % (Invitrogen, Groningen, Los Países Bajos). Además, una mezcla de estándar de proteína Mark 12 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE, UU.) fue aplicado al gel.

[0276] El gel fue analizado en un aparato de gel Xcell SureLock™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante 50 minutos a 200 V. El tampón del análisis fue hecho por una dilución multiplicada por 20 del tampón estándar (1 M MOPS, 1 M TRIS y SDS al 1%). Se añadió un 0,5 ml volumen de antioxidante NuPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) a la cámara de tampón de (cátodo) superior. Después de la electroforesis, el gel fue incubado durante 60 minutos en una solución de coloración que consiste en Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,% (p/v) disuelto en ácido acético al 10%,metanol al 40% y H_2 O al 50%. La decoloración del gel fue realizada en ácido acético al10%, metanol al 30% y H_2 O al 60%.

[0277] Antes de la purificación, el filtrado fue concentrado y el tampón cambiado a 20 mM de trietanolamina (TEA)-HCl pH 7.5 usando una unidad de ultrafiltración Amicon equipada con un PM10 de membrana con 10 kDa de punto de corte (Millipore, Bedford, MA, EE. UU.). La purificación enzimática fue realizada a temperatura ambiente usando un sistema FPLC (Amersham Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia). Entre cada paso de purificación, el tampón fue cambiado en las fracciones agrupadas al tampón de muestra usando una uUnidad de ultrafiltración Amicon o una unidad de ultrafiltración Microsep de 3,5 ml con un punto de corte de 10 kDa (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, EE. UU.). La elución de la beta-glucosidasa fue monitoreada a 280 nm.

[0278] El retenido (38,5 ml) fue cargado sobre una columna XK 26 dotada con 75 ml de Q Sepharose HP (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia). La columna fue lavada con 180 ml de tampón de muestra. El tampón de muestra fue 20 mM de TEA-HCl pH 7,5. La enzima fue eluida con un gradiente hasta 50% (sobre 800 ml) de 20 mM de TEA-HCl pH 7,5 con 1 M NaCl. Las fracciones de 10 ml fueron recogidas, evaluadas en cuanto a la actividad de beta-glucosidasa y las fracciones 81 a 85 fueron agrupadas.

[0279] El retenido (2,0 ml) del paso anterior fue cargado sobre una columna Superdex 75 10/300 GL (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) usando 100 mM de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8 con 200 mM de NaCl como el tampón de muestra. La enzima fue eluida con 60 ml del mismo tampón. Las fracciones de 2 ml fueron recogidas, evaluadas en cuanto a la actividad de la beta-glucosidasa, y las fracciones 6 a 9 fueron agrupadas según la actividad y la pureza (SDS-PAGE).

[0280] El retenido (14 ml) del paso de Superdex 75 fue cargado sobre una columan de 6 ml de RESOURCE Q (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) usando 10 mM de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8 como el tampón de muestra. La columna fue lavada con 30 ml de tampón de muestra. La enzima fue eluida con un gradiente hasta 50% (sobre 180 ml) de 500 mM de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8. Las fracciones de 2 ml fueron recogidas, evaluadas en cuanto a la actividad de la beta-glucosidasa, y las fracciones 49 a 61 fueron agrupadas según la actividad y la pureza (SDS-PAGE).

[0281] El retenido (12 ml) del paso RESOURCE Q fue cargado sobre otra columna de 6 ml de RESOURCE Q (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) usando 10 mM $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8 como el tampón de muestra. La columna fue lavada con 30 ml de tampón de muestra. La enzima fue eluida con un gradiente hasta 50% (sobre 300 ml) de 500 mM de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8. Las fracciones de 2 ml fueron recogidas, evaluadas en cuanto a la actividad de la beta-glucosidasa y las fracciones 63 a 67 fueron agrupadas según la actividad y de pureza específicas (SDS-PAGE).

[0282] El retenido (10,5 ml) del paso RESOURCE Q fue cargado sobre una columna Source S de 10 ml (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) usando 10 mM $NaCH_3$ CO_2 pH 4,.0 como el tampón de muestra. La columna fue lavada con 31.5 ml de tampón de muestra. La enzima fue eluida con un gradiente hasta 15% (sobre 120 ml) de 1 M de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,0 y luego con un gradiente de 15% a 100% (sobre 90 ml) de 1 M de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,0. Las fracciones de 2

ml fueron recogidas, evaluadas en cuanto a la actividad de la beta-glucosidasa y las fracciones 93 a 107 fueron agrupadas según la actividad y de pureza específicas (SDS-PAGE).

[0283] El retenido (2 ml) del paso Source S fue cargado sobre una columna Superdex 200 H10/300 GL (Amersham Bioscience, Uppsala,Suecia) usando 100 mM de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8 con 200 mM de NaCl como el tampón de muestra. La enzima fue eluida con 50 ml del mismo tampón. Las fracciones de 0,5 ml fueron recogidas, evaluadas en cuanto a la actividad de la beta-glucosidasa y las fracciones 28 a 31 fueron agrupadas según la actividad y pureza específicas (SDS-PAGE).

[0284] El retenido (8,0 ml) del paso Superdex 200 fue cargado sobre una columna Phenyl Sepharose HP de 1 ml (Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) usando 1 M de $(NH_4)_2$ SO_4 , 50 mM de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8 como el tampón de muestra. La columna fue lavada con 17,0 ml del tampón de muestra. La enzima fue eluida con un gradiente hasta 100% (sobre 70 ml) de 50 mM de $NaCH_3$ CO_2 pH 4,8. Las fracciones de 0,5 ml fueron recogidas, evaluadas en cuanto a la actividad de la beta-glucosidasa y las fracciones 73 a 78 fueron agrupadas según la actividad y pureza específicas (SDS-PAGE).

[0285] El SDS-PAGE de la beta-glucosidasa purificada mostró sólo una banda a aproximadamente 115 kDa. El isoelectroenfoque fue realizado con un sistema Pharmacia PhastSystem usando geles IEF, pH 3-9 y una mezcla estándar con pls 3,5-9,3. El gel fue manchado por el método de plata para medios IEF FastGel. Se determinó que el punto isoeléctrico fue aproximadamente 3,9.

Ejemplo 4: Secuenciación de N-terminal

[0286] Se añadió una alícuota de beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* de 100 µl purificada (Ejemplo 3) a 100 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE (4 ml de 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8, 20 ml de SDS al 10%, 20 ml de glicerol (87%), 56 ml de H_2 O Milli Q filtrado y 15 granos de azul de bromfenol) en un tubo de Eppendorf y se calentó a 95 °C durante 4 minutos. Después del calentamiento, cuatro alícuotas de 20 µl de la muestra diluida fueron aplicadas separadamente a un gel de poliacrilamida SDS al 4-20% precast (Invitrogen, Carlsbad, CA; EE. UU.). Además de las cuatro sendas con la muestra, una mezcla estándar de proteína 12.

[0287] El gel fue analizado en aparato de gel Xcell SureLock™ durante 90 minutos con ajustes de potencia inicial de 40 mA como máximo 135 V. Después de la electroforesis, el gel fue incubado durante 5 minutos en una solución secante que consiste en 10 mM de CAPS pH 11 con metanol al 6%. Una membrana ProBlott (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) fue mojada durante 1 minuto en metanol puro antes de ser colocada en la solución secante durante 5 minutos para saturar la membrana con 10 mM de CAPS pH 11 con metanol al 6%.

[0288] La electrotransferencia se efectuó en un aparato Semi Dry Blotter II (KemEnTec, Copenhagen, Dinamarca) de la siguiente manera. Seis piezas de papel mojado Whatman n.º 1 en la solución secante fueron colocadas en el electrodo positivo del aparato secante seguido por la membrana ProBlott, el gel de poliacrilamida y seis piezas de papel mojado Whatman n.º 1 en solución secante. El aparato secante fue ensamblado así poniendo el electrodo negativo en contacto con la pila superior de papel Whatman n.º 1. Un peso de 11,3 kg fue colocado encima del aparato secante. La electrotransferencia fue realizada a una corriente de 175 mA durante 180 minutos.

[0289] Después de la electrotransferencia, la membrana ProBlott fue manchada durante 1 minuto en Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,1% (p/v) disuelto en metanol al 60%, ácido acético al 1% , H_2 O al 39%. La decoloración de la membrana ProBlott fue realizada en metanol acuoso al 40% durante 5 minutos antes de que las membranas fueran enjuagadas en agua desionizada. Finalmente, la membrana ProBlott se secó por aire.

[0290] Para la secuenciación de aminoácido N-terminal, dos piezas de la membrana ProBlott que consiste en una banda de 115 kDa fueron cortadas y colocadas en el cartucho secante de un Applied Biosystems Procise Protein Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU). La secuenciación N-terminal se efectuó usando el fichero de análisis de método para muestras de membrana de PVDF (PVDF de líquido pulsado) según las instrucciones del fabricante.

[0291] La secuencia de aminoácidos del N-terminal fue deducida de los cromatogramas resultantes por comparación del tiempo de retención de los picos en los cromatogramas con los tiempos de retención de los aminoácidos PTH en el cromatograma estándar.

[0292] La secuencia de aminoácidos N-terminal de la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* purificada fue determinada directamente usando un Procise 494 HT Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.). Se determinó la secuencia N-terminal fue Ala-Ile-Glu-Ser-Phe-Ser-Glu-Pro-Phe-Tyr-Pro-Ser-X-X-Met-Asn (aminoácidos 37 a 52 de SEC ID n.º: 2). X define un residuo de aminoácido indeterminado.

Ejemplo 5: Amplificaciones PCR

[0293] Sobre la base de la secuencia de aminoácidos de N-terminal de la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* purificada (Ejemplo 4), se diseñó un cebador directo como se muestra más abajo usando la estrategia CODEHOP (Rose et al., 1998, Nucleic Acids Res. 26: 1628-35). A partir de la información de la base de datos en otras beta-glucosidasas, se diseñó un cebador inverso como se muestra más abajo usando la estrategia CODEHOP.

Cebador directo:

5'-GCGCTATCGAGTCTTTCTCTGARCCNTTYTA-3' (SEC ID n.º: 3)

Cebador inverso:

5'-GTCGGTCATGACGAAGCCNKGRAANCC-3' (SEC ID N.º: 4)

donde R=A o G, Y=C o T, K=G o T y N=A, C, G o T.

[0294] Las reacciones de la amplificación (30 µl) fueron preparadas usando aproximadamente 1 µg de ADN genómico de *Penicillium brasilianum* como molde. Además, cada reacción contenía los siguientes componentes: 30 pmol del cebador directo, 30 pmol del cebador inverso, 200 µM cada uno de tampón de polimerasa de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 1X AmpliTaq (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) y unidad de 0,5 de polimerasa AmpliTaq (5,0 Ul/µl, Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU). Las reacciones fueron incubadas en un Robocycler (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) programadas durante 1 ciclo a 96 °C durante 3 minutos y a 72 °C durante 3 minutos; 34 ciclos cada una a 95°C durante 0,5 minuto, 56 °C durante 0,5 minutos y 72 °C durante 1,5 minutos; 1 ciclo a 72 ºC durante 7 minutos; y un ciclo de remojo a 6 °C. La polimerasa Taq fue añadida a 72 °C en el primer ciclo.

[0295] Los productos de reacción PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2% (Amresco, Solon, OH, EE. UU.) usando tampón TAE. Una banda de aproximadamente 840 bp fue cortada del gel y purificada usando un equipo de extracción de gel de MiniElute™ (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. El producto de PCR purificado fue posteriormente clonado en un vector pCR2.1 TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante para producir un vector designado pCR2.1GH3A (Figura 2) y analizado por secuenciación del ADN para confirmar su identidad como una hidrolasa de glicosil de Familia 3.

Ejemplo 6: Selección de de la biblioteca genómica

[0296] Las transferencias de colonias fueron realizadas (Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York) y el ADN fue reticulado sobre membranas Hybond N+ (Amersham, Arlington Heights, IL) durante 2 horas a 80 °C. Las membranas de las transferencias de colonias fueron premojadas usando 0.2X SSC (0,03 M de NaCl, 0,003 M de citrato sódico), SDS al 0,2%. Los filtros premojados fueron colocados en un vaso de precipitación con 7,5 ml desolución de hibridación (6X SSPE [0,9 M de NaCl, 0,06 M de NaH_2PO_4 y 6 mM de EDTA], SDS al 7%) por filtro a 68 °C en un baño de maría de agitación durante 0,5 hora. El producto subclonado de la amplificación PCR descrito en el Ejemplo 5 fue amplificado de pCR2.1GH3A por amplificación PCR usando cebadores homólogos al vector, como se muestra a continuación.

5'-CTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTA-3' (SEC ID n.º: 5)

5'-ATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGAT-3' (SEC ID N.º: 6)

[0297] Las reacciones de amplificación (30 µl) fueron preparadas usando aproximadamente 50 ng de pCR2.1GH3A como molde. Además, cada reacción contenía los siguientes componentes: cinquenta picomoles de cada uno de los cebadores, tampón 1X Taq (New England Biolabs, Beverly, MA), 15 pmol cada uno de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, y 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa (New England Biolabs, Beverly, MA, EE. UU). Las reacciones fueron incubadas en un Robocycler programado durante 1 ciclo a 94 °C durante 1 minuto; y 20 ciclos cada uno a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 60 segundos y 72 °C durante 1 minuto. El bloque de calor luego fue a unciclo de remojo de 4 °C. Los productos reactivos fueron aislados en un gel de agarosa al 2,0% usando tampón TAE, y un 1 kb de banda de producto fue cortado del gel y purificado usando un QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

[0298] Aproximadamente 40 ng fue marcado con cebador aleatorio usando un Stratagene Prime-It II Kit (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. El fragmento de gen radiomarcado fue separado del nucleótido no-incorporado usando un equipo de purificación PCR MinElute (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.).

[0299] La sonda radiactiva fue desnaturalizada añadiendo 5,0 M de NaOH a una concentración final de 0,5 M, y fue añadida a la solución de hibridación a una actividad de aproximadamente 0,5 x 10^6 cpm por ml de solución de hibridación. La mezcla fue incubada durante 10 horas a 68 °C en un baño de maría de agitación. Después de la incubación, las membranas fueron lavadas tres veces en 0.2X SSC, SDS al 0,2% a 68°C. Las membranas luego fueron secadas en papel secante durante 15 minutos, envueltas en SaranWrap™ y expuestas a película radiográfica durante toda la noche a -80 °C con filtros intensificadores (Kodak, Rochester, NY, EE. UU.).

[0300] Las colonias que producen señales de hibridación con la sonda fueron inoculadas en 1 ml de medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml y cultivadas durante toda la noche a 37 °C. Se llevaron a cabo las diluciones de cada solución y 100 µl fueron colocadas en placas sobre placas de agar LB suplementadas con 100 µg de ampicilina por ml. La dilución para cada positivo que produjo aproximadamente 40 colonias por placa fue elegida para transferencias secundarias. Las trasferencias fueron preparadas hibridizadas y evaluadas como se indica más arriba. Dos colonias de cada placa positiva fueron inoculadas en 3 ml de medio LB suplementado con 100 µg de ampicilina por ml y cultivadas durante toda la noche a 37 °C.

[0301] ADN de miniprep se obtuvo a partir de cada colonia usando un Bio Robot 9600 (QIAGEN Inc, Valencia, CA, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. El tamaño de cada inserto fue determinado por digestión Eco RI y electroforesis

en gel de agarosa. Dos clones designados AB1 y AB2 cada uno contenían un inserto de aproximadamente 4.5 kb. La secuenciación reveló que los clones fueron idénticos, se los denominó en adelante pKKAB (Figura 3).

Ejemplo 7: Caracterización de la secuencia genómica de *Penicillium brasilianum* que codifica beta glucosidasa

[0302] La secuenciación del ADN del gen de beta-glucosidasa *Penicillium brasilianum* de pKKAB fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado Applied Biosystems Modelo 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) usando la técnica de caminata de cebador con química de terminador de coloración (Giesecke et al., 1992, J. Virol. Methods 38: 47-60).

[0303] La secuencia genómica codificante (SEC ID n.º: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID n.º: 2) se muestran en las Figuras 1A y 1B. La secuencia genómica codificante de 2751 pb (incluido el codón de terminación) codifica un polipéptido de 878 aminoácidos con una masa molecular calculada de 96,725 Da, interrumpida por 2 intrones de 57 pb (85-141 pb) y 57 pb (de 312 368 pb). El contenido de %G+C del gen es 51,9% y de la región de codificación de proteína madura (nucleótidos 171 a 2753 de SEC ID n.º: 1) es 52%. Usando el programa de software SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6), se predijo un péptido señal de 19 residuos. Sobre la base de la secuencia N-terminal de la beta-glucosidasa, los residuos 20 al 36 parecen constituir una región de propéptido que está proteolíticamente dividida durante la maduración. La proteína madura predicha contiene 842 aminoácidos.

[0304] Se realizó una búsqueda de secuencias similares en bases de datos públicas con el paquete de programa FASTA, versión 3.4 (Pearson and D. J. Lipman, 1988, PNAS 85:2444 , and Pearson, 1990, Methods in Enzymology 183:63) usando parámetros predeterminados. Los alineamientos de parejas del algoritmo Smith-Waterman del paquete (Waterman et a/., 1976, Adv. Math. 20 367) se utilizaron para la determinación de la identidad en porcentaje. Los parámetros predeterminados incluyeron una penalización de apertura de gaps de -12, una penalización de extensión de gaps de -2, y la matriz de comparación BLOSUM50. Los alineamientos mostraron que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Penicillium brasilianum* que codifica un polipéptido GH3A con actividad de beta-glucosidasa compartió 63,8% de identidad (incluidos los gaps) a la secuencia de aminoácidos deducida de una proteína hipotética de *Neurospora crassa* (número de acceso Q7RWP2) y 61,8% de identidad con una beta-glucosidasa de Familia 3 de glicosil hidrolasa caracterizada de *Aspergillus cellulolyticus* (número de acceso ABB07868).

[0305] Las células TOP10 de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) con plásmido pKKAB fueron depositadas en la colección de Patentes de Cutivos del Servicio de Investigación para la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604, como NRRL B-30860, con una fecha de depósito de 8 de julio de 2005.

Ejemplo 8: Construcción de un plásmido de expresión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae*

[0306] El plásmido de expresión de *Aspergillus* pJaL721 (WO 03/008575) consiste en un cassette de expresión basado en el promotor de amilasa neutra II de *Aspergillus niger* fundido a la secuencia guía no traducida de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (NA2/tpi) y el terminador de amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También está presente en el plásmido el marcador selectivo *amdS* de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en acetamida como fuente de nitrógeno única y el marcador URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* que permite el crecimiento de la cepa DB6507 de *Escherichia coli* defectuosa de *pyrF* (ATCC 35673). La transformación en *E. coli* DB6507 fue realizada usando el gen URA3 de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador selectivo como se describe más abajo.

[0307] *E. coli* DB6507 se volvió competente por medio del método de Mandel y Higa, 1970, J. Mol. Biol. 45: 154. Los transformantes fueron seleccionados en medio M9 sólido (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York) suplementado por litro con 1 g de ácidos de casamino, 500 µg de tiamina y 10 mg de canamicina.

[0308] El gen de beta-glucosidasa fue clonado en pJaL721 como se describe más abajo. El gen de beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* fue amplificado por PCR usando los siguiente dos cebadores oligonucleótidos:

PCR directo:

5'-AATTTGATCACACCATGCAGGGTTCTACAATCTTTCTGCC-3' (SEC ID n.º: 7)

PCR inverso:

5'-TTAACTCGAGTTACTCCAATTGTGAGCTCAGCGG-3' (SEC ID n.º: 8)

[0309] Para facilitar la clonación, un sitio de enzima de restricción fue insertado en el 5' extremo de cada cebador donde el cebador directo contenía un sitio *Bcl* I y el cebador inverso contenía un sitio *Xho* I.

[0310] El clon AB (ejemplo 6) fue usado como molde en la reacción de PCR. La reacción fue realizada en un volumen de 50 µl con 1,0 unidad de Phusion (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 1X tampón Phusion HF (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia), 25 ng de clon AB, 250 µM de cada dNTP y 50 pmol de cada uno de los dos cebadores anteriormente descritos. La amplificación se efectuó en un PTC-220 DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Inc., Waltham, MA, EE. UU.) programado durante 1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos; 24 ciclos cada uno a 94 °C durante 0,5 minuto, 58 °C durante 0,5 minuto y 6 8°C durante 4.0 minutos; y 1 ciclo a 68°C durante 15 minutos. La técnica de PCR

de inicio en caliente (Chou et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20: 1717) fue usada y la polimerasa Phusion fue añadida después de 1 minuto del primer ciclo.

[0311] La reacción de PCR produjo un único fragmento de ADN de aproximadamente 2700 pb en longitud. El fragmento fue digerido con *Bcl* I y *Xho* I y aislado por electroforesis en gel de agarosa, purificado y clonado en pJaL721 digerido con Bam HI y *Xho I*, dando como resultado un plásmido designado pKBK01 (Figura 4). La secuencia del gen de beta-glucosidasa en pKBK01 fue verificada por secuenciación del ADN.

Ejemplo 9: Expresión de la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* en *Aspergillus oryzae*

[0312] BECh2 de *Aspergillus oryzae* (WO 00/30322) fue transformado con 5 µg de pKBK01 como se describe por Christensen et al., 1988, Biotechnology 6: 1419-1422.

[0313] Los transformantes fueron cultivados en tubos de 50 ml durante 4 días a 30 °C en 10 ml de medio YPM. Los caldos enteros fueron centrifugados a 12.100 x g y los sobrenadantes fueron quitados. Los sobrenadantes fueron analizados por SDS-PAGE usando un Gel Precast criterio Criterion XT, gel de Bis-Tris al 10% en un tampón XT MES (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU,) según las instrucciones del fabricante. Un volumen de 10 µl de sobrenadante fue mezclado con 9 µl de tampón de muestra (0,125 M de Tris-HCl pH 6,8, glicerol al 20% y SDS al 4,6%) y 1 µl de 1 M de ditiotreitol y fue calentado a 96 °C durante 5 minutos. En 8 de 28 sobrenadantes, una banda de aproximadamente 115 kDa fue visible en el intervalo de los estándares 35 kDa a 150 kDa por SDS-PAGE. Los sobrenadantes que dieron como resultado una banda a aproximadamente 115 kDa también contenía actividad de beta-glucosidasa, evaluada como se describe en el Ejemplo 3. A medida que más alta es la intensidad de la banda, más actividad de beta-glucosidasa se mide en el mismo sobrenadante.

[0314] Un transformante fue designado *Aspergillus oryzae* KBK01.

Ejemplo 10: Producción y purificación de beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* recombinante

[0315] El transformante de Aspergillus oryzae KBK01 fue cultivado en un biorreactor durante 24 horas en un medio compuesto por litro de 60 g de sacarosa, 10 g de $MgSO_4 \cdot H_2O$, 10 g de KH_2PO_4, 15 g de K_2SO_4, 20 g de ácido cítrico, 50 g de extracto de levadura, 0,5 ml de metales traza y 1 ml de ácido plurónico. Los metales traza estaban compuestos por litro de 14,28 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,50 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 2,5 g de $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 13,8 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 8,5 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ y 3,0 g de ácido cítrico. Después de 1 día, una solución de maltosa fue alimentada en el biorreactor compuesto por litro de 350 g de solución de maltosa al 75%, 5 g de ácido cítrico, 10 g de extracto de levadura, 0,5 ml de metales traza y 5 ml de ácido plurónico. Después de 5 días, se detuvo el cultivo.

[0316] La biomasa fue quitada de 2,5 litros de caldo de fermentación por centrifugado y filtración. El sobrenadante resultante fue llevado a 5 litros con agua desionizada y ultrafiltrado en un Filtron con una membrana OS10C72 de 10 kDa (Filtron, EE. UU.). El volumen resultante de 1,2 litros fue ajustado a pH 8.5.

[0317] La actividad de beta-glucosidasa fue medida como se describe en el Ejemplo 3. La concentración de proteína fue determinada como se describe en el Ejemplo 3. El análisis de SDS-PAGE fue realizado como se describe en el Ejemplo 3. La elución de la beta-glucosidasa fue monitoreada a 280 nm.

[0318] La solución de beta-glucosidasa fue cargada sobre una columna Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) preequilibradas con 25 mM de Tris pH 8,5. La beta-glucosidasa fue eluida con un gradiente de 0 a 1 M de NaCl (volúmenes de 5 columnas) en 25 mM de Tris pH 8,5. Las fracciones con la beta-glucosidasa fueron agrupadas en un volumen de 105 ml.

[0319] Una parte de la agrupación (40 ml) del paso de Q-Sepharose fue purificada adicionalmente en una columna de Sephacryl S-200 preequilibrada en 0,1 M de acetato sódico pH 6,0. La beta-glucosidasa fue eluida con el mismo tampón en un volumen de 68 ml.

[0320] El contenido de proteína fue determinada de la absorbencia a 280 nm y el coeficiente de extinción fue calculado a partir de la estructura primaria de la beta-glucosidasa.

[0321] La purificación fue seguida por SDS-PAGE. Las muestras fueron hervidas durante 2 minutos con un volumen igual de tampón de muestra 2X y 1/5 de volumen de PMSF al 1% y fueron cargadas sobre un gel de Tris-glicina al 4-20% de Novex. El gel fue manchado con GelCode Blue Stain Reagent y desmanchado con agua. SDS-PAGE reveló una banda de aproximadamente 115 kDa.

Ejemplo 11: Caracterización de beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* recombinante purificada

[0322] La beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* recombinante purificada descrita en el Ejemplo 10 fue caracterizada con respecto a pH óptimo, temperatura óptima, estabilidad de temperatura y especificidad de sustrato.

[0323] pH óptimo y temperatura óptima La actividad de la beta-glucosidasa fue medida a temperaturas de 20 °C a 90 °C y a valores de pH de 3,0 a 8,0. La beta-glucosidasa purificada fue diluida en agua MilliQ para asegurar que el 4-nitrofenol desarrollado en el ensayo estuvo dentro de la curva estándar. El sustrato fue 1 mM 4-nitrophenyl-beta-o-glucopiranoside en 50 mM citrato sódico ajustado a pH 3.18, 4.16, 4.86, 6.17 y en 50 mM carbonato de sodio ajustado a pH 7.07 y 8.13. La actividad fue medida durante 10 minutos y la reacción fue terminada con 0,5 M de glicina/NaOH pH 10 con 2 mM de EDTA.

[0324] La Figura 5 muestra la actividad relativa de la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888 a valores de pH diferentes como una función de la temperatura.

[0325] La Figura 6 muestra la actividad relativa de la beta-glucosidasa *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888 a temperaturas diferentes como una función de pH.

[0326] Estabilidad de la temperatura para Novozym 188 y beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888. La estabilidad de la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* y Novozim 188 (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) fueron evaluadas a temperaturas de 20 °C a 67.,5 °C y a valores de pH de 3 a 8 durante un periodo de 24 horas. Las preparaciones enzimáticas fueron diluidas 2000 veces en el tampón de incubación. Los tampones de incubación de pH 3 a pH 6 contenían 10 mM de citrato sódico ajustado al pH deseado y los tampones de incubación de pH 7 y pH 8 contenían 10 mM de carbonato de sodio ajustado al pH deseado. La actividad residual fue medida a temperatura ambiente durante un periodo de 10 minutos. El sustrato fue 1 mM de 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranósido en 50 mM de citrato sódico ajustado a pH 4,80, y la reacción fue terminada con 0,5 M de glicina/NaOH pH 10 con 2 mM de EDTA.

[0327] La Figura 7 muestra la actividad residual de Novozym 188 después de 24 horas de incubación a temperatura y pH diferentes (n=2).

[0328] La Figura 8 muestra la actividad residual de la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888 después de 24 horas de incubación a temperaturay pH diferentes (n=3).

[0329] La beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888 fue estable a pH 4 a pH 6 hasta 60 °C durante un periodo de 24 horas. Novozym 188 fue estable a pH 4 y pH 5 hasta 50 °C durante un periodo de 24 horas y a pH 6 hasta 40 °C durante un periodo de 24 horas.

Parámetros cinéticos para la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888

[0330] Sustrato 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranosida. Los parámetros cinéticos fueron medidos usando 4-nitrofenil beta-d-glucopiranósido en concentraciones entre 0,07 y 2 mM en 50 mM de citrato sódico pH 4,80. La actividad fue medida durante 2 minutos a temperatura ambiente y la reacción fue terminada con 0,5 M deglicina/NaOH pH 10 con 2 mM de EDTA, y medida como se describe en el Ejemplo 3.

[0331] La constante k_m de Michaelis-Menten y la velocidad de reacción máxima fueron determinadas a partir de cuatro diluciones independientes de la enzima. Las mediciones que mostraron inhibición de sustrato fueron omitidas en la determinación de los parámetros cinéticos. De una representación de Lineweaver-Burk se determinó que los parámetros fueron k_m = 0,077 ± 0,021 mM y V_{max} = enzima 78,2 ± 7,2 U/mg. El uso de un gráfico de Hanes para determinar los parámetros dio como resultado una desviación de los parámetros inferior a uno por ciento.

[0332] La Figura 9 muestra la velocidad de reacción inicial en concentraciones de 4-nitrofenil-beta-D-glucopirano diferentes para la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888.

[0333] Sustrato de celobiosa Los parámetros cinéticos fueron medidos usando celobiosa en concentraciones entre 0,08 y 10 mM en 50 mM de acetato sódico pH 4,80. La actividad fue medida durante 5 minutos a temperatura ambiente y la reacción fue terminada con 0,5 M de glicina/NaOH pH 10 con 2 mM de EDTA, y luego fue calentada a 65 °C durante 10 minutos. El pH luego fue ajustado a pH 7,1 con 1 M de HCl y medido con Ecoline S+ Glucose (DiaSys Diagnostics Systems GmbH, Holzheim, Alemania). Los parámetros de Michaelis-Menten fueron determinados con un ajustador de curvas no lineales usando el algoritmo de Marquardt-Levenberg (SigmaPlot 9.01, Systat Software, Inc.).

[0334] Se determinó que la constante k_m de Michaelis-Menten y la velocidad de reacción máxima para la hidrólisis de celobiosa fueron 1,58 mM y 28 U/mg, respectivamente. Una unidad es definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ de mol de celobiosa por minuto.

[0335] La Figura 10 muestra la velocidad de reacción inicial en concentraciones de celobiosa diferentes para la beta-glucosidasa de *Penicillium brasilianum* cepa IBT 20888.

Depósito de material biológico

[0336] El siguiente material biológico ha sido depositado según las condiciones del Tratado de Budapest con la colección de Patentes de Cutivos del Servicio de Investigación para la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center, 1815 University Street, Peoria, Illinois, 61604 y se le ha asignado el siguiente número de acceso::

Depósito	Número de acceso	Fecha de depósito
E. coli TOP10 pKKAB	NRRL B-30860	8 de julio de 2005

[0337] La cepa ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente para una persona determinada por el Comisario de Patentes y Marcas Registradas a tener derecho a ellas bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122. El depósito representa un cultivo substancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según lo requieran las leyes de patentes extranjeras en países donde se soliciten equivalentes de la solicitud en cuestión, o su progenie. No obstante, debe

entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención en cuestión en derogación del derecho de las patentes concedido por acción gubernamental.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0338]

<110> Novozymes, Inc.

Novozymes A/S

Krogh, Kristian

Harris, Paul

<120> Polipéptidos con actividad de beta-glucosidasa y polinucleótidos que codifican los mismos

<130> 10829.204-WO

<150> 60/705,607

<151> 2005-08-04

<160> 8

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2800

<212> DNA

<213> Penicillium brasilianum

<400>1

ccgaatttga ttctggcttg agcttctggg gctctaacct caccattgca attctgaacg 1140
gcacggttcc cgaatggcgc ctggatgaca tggcgatgcg aattatggct gcatacttca 1200
aagttggcct tactattgag gatcaaccag atgtcaactt caatgcctgg acccatgaca 1260
cctacggata taaatacgct tatagcaagg aagattacga gcaggtcaac tggcatgtcg 1320
atgttcgcag cgaccacaat aagctcattc gcgagactgc cgcgaagggt acagttctgc 1380
tgaagaacaa ctttcatgct ctccctctga agcagcccag gttcgtggcc gtcgttggtc 1440
aggatgccgg gccaaacccc aagggcccta acggctgcgc agaccgagga tgcgaccaag 1500
gcactctcgc aatgggatgg ggctcagggt ctaccgaatt cccttacctg gtcactcctg 1560
acactgctat tcagtcaaag gtcctcgaat acggggggtcg atacgagagt atttttgata 1620
actatgacga caatgctatc ttgtcgcttg tctcacagcc tgatgcaacc tgtatcgttt 1680
ttgcaaatgc cgattccggt gaaggctaca tcactgtcga caacaactgg ggtgaccgca 1740
acaatctgac cctctggcaa aatgccgatc aagtgattag cactgtcagc tcgcgatgca 1800
acaacacaat cgttgttctc cactctgtcg gaccagtgtt gctaaatggt atatatgagc 1860
acccgaacat cacagctatt gtctgggcag ggatgccagg cgaagaatct ggcaatgctc 1920
tcgtggatat tctttggggc aatgttaacc ctgccggtcg cactccgttc acctgggcca 1980
aaagtcgaga ggactatggc actgatataa tgtacgagcc caacaacggc cagcgtgcgc 2040
ctcagcagga tttcaccgag agcatctacc tcgactaccg ccatttcgac aaagctggta 2100
tcgagccaat ttacgagttt ggattcggcc tctcctatac caccttcgaa tactctgacc 2160
tccgtgttgt gaagaagtat gttcaaccat acagtcccac gaccggcacc ggtgctcaag 2220
caccttccat cggacagcca cctagccaga acctggatac ctacaagttc cctgctacat 2280
acaagtacat caaaaccttc atttatccct acctgaacag cactgtctcc ctccgcgctg 2340
cttccaagga tcccgaatac ggtcgtacag actttatccc accccacgcg cgtgatggct 2400
cccctcaacc tctcaacccc gctggagacc cagtggccag tggtggaaac aacatgctct 2460
acgacgaact ttacgaggtc actgcacaga tcaaaaacac tggcgacgtg gccggcgacg 2520
aagtcgtcca gctttacgta gatctcgggg gtgacaaccc gcctcgtcag ttgagaaact 2580
ttgacaggtt ttatctgctg cccggtcaga gctcaacatt ccgggctaca ttgacgcgcc 2640
gtgatttgag caactgggat attgaggcgc agaactggcg agttacggaa tcgcctaaga 2700
gagtgtatgt tggacggtcg agtcgggatt tgccgctgag ctcacaattg gagtaatgat 2760
catgtctacc aatagatgtt gaatgtctgg tgtggatatt 2800

<210> 2

<211> 878

<212> PRT

<213> Penicillium brasilianum

<400>2

Met Gln Gly Ser Thr Ile Phe Leu Ala Phe Ala Ser Trp Ala Ser Gln
1 5 10 15

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

His Gly Pro Gln Ala Ile Glu Ser Phe Ser Glu Pro Phe Tyr Pro Ser
35 40 45

Pro Trp Met Asn Pro His Ala Glu Gly Trp Glu Ala Ala Tyr Gln Lys
50 55 60

Ala Gln Asp Phe Val Ser Gln Leu Thr Ile Leu Glu Lys Ile Asn Leu
65 70 75 80

Thr Thr Gly Val Gly Trp Glu Asn Gly Pro Cys Val Gly Asn Thr Gly
85 90 95

Ser Ile Pro Arg Leu Gly Phe Lys Gly Phe Cys Thr Gln Asp Ser Pro
100 105 110

Gln Gly Val Arg Phe Ala Asp Tyr Ser Ser Ala Phe Thr Ser Ser Gln
115 120 125

Met Ala Ala Ala Thr Phe Asp Arg Ser Ile Leu Tyr Gln Arg Gly Gln
130 135 140

Ala Met Ala Gln Glu His Lys Ala Lys Gly Ile Thr Ile Gln Leu Gly
145 150 155 160

Pro Val Ala Gly Pro Leu Gly Arg Ile Pro Glu Gly Gly Arg Asn Trp
165 170 175

Glu Gly Phe Ser Pro Asp Pro Val Leu Thr Gly Ile Ala Met Ala Glu
180 185 190

Thr Ile Lys Gly Met Gln Asp Thr Gly Val Ile Ala Cys Ala Lys His
195 200 205

2 Tyr Ile Gly Asn Glu Gln Glu His Phe Arg Gln Val Gly Glu Ala Ala

210 215 220

Gly His Gly Tyr Thr Ile Ser Asp Thr Ile Ser Ser Asn Ile Asp Asp
225 230 235 240

Arg Ala Met His Glu Leu Tyr Leu Trp Pro Phe Ala Asp Ala Val Arg
245 250 255

Ala Gly Val Gly Ser Phe Met Cys Ser Tyr Ser Gln Ile Asn Asn Ser
260 265 270

Tyr Gly Cys Gln Asn Ser Gln Thr Leu Asn Lys Leu Leu Lys Ser Glu
275 280 285

Leu Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Gly Ala His His Ser
290 295 300

Gly Val Ser Ser Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp
305 310 315 320

Thr Glu Phe Asp Ser Gly Leu Ser Phe Trp Gly Ser Asn Leu Thr Ile
325 330 335

Ala Ile Leu Asn Gly Thr Val Pro Glu Trp Arg Leu Asp Asp Met Ala
340 345 350

Met Arg Ile Met Ala Ala Tyr Phe Lys Val Gly Leu Thr Ile Glu Asp
355 360 365

Gln Pro Asp Val Asn Phe Asn Ala Trp Thr His Asp Thr Tyr Gly Tyr
370 375 380

Lys Tyr Ala Tyr Ser Lys Glu Asp Tyr Glu Gln Val Asn Trp His Val
385 390 395 400

Asp Val Arg Ser Asp His Asn Lys Leu Ile Arg Glu Thr Ala Ala Lys
405 410 415

Gly Thr Val Leu Leu Lys Asn Asn Phe His Ala Leu Pro Leu Lys Gln
420 425 430

Pro Arg Phe Val Ala Val Val Gly Gln Asp Ala Gly Pro Asn Pro Lys
435 440 445

Gly Pro Asn Gly Cys Ala Asp Arg Gly Cys Asp Gln Gly Thr Leu Ala

450 455 460

Met Gly Trp Gly Ser Gly Ser Thr Glu Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro
465 470 475 480

Asp Thr Ala Ile Gln Ser Lys Val Leu Glu Tyr Gly Gly Arg Tyr Glu
485 490 495

Ser Ile Phe Asp Asn Tyr Asp Asp Asn Ala Ile Leu Ser Leu Val Ser
500 505 510

Gln Pro Asp Ala Thr Cys Ile Val Phe Ala Asn Ala Asp Ser Gly Glu
515 520 525

Gly Tyr Ile Thr Val Asp Asn Asn Trp Gly Asp Arg Asn Asn Leu Thr
530 535 540

Leu Trp Gln Asn Ala Asp Gln Val Ile Ser Thr Val Ser Ser Arg Cys
545 550 555 560

Asn Asn Thr Ile Val Val Leu His Ser Val Gly Pro Val Leu Leu Asn
565 570 575

Gly Ile Tyr Glu His Pro Asn Ile Thr Ala Ile Val Trp Ala Gly Met
580 585 590

Pro Gly Glu Glu Ser Gly Asn Ala Leu Val Asp Ile Leu Trp Gly Asn
595 600 605

Val Asn Pro Ala Gly Arg Thr Pro Phe Thr Trp Ala Lys Ser Arg Glu
610 615 620

Asp Tyr Gly Thr Asp Ile Met Tyr Glu Pro Asn Asn Gly Gln Arg Ala
625 630 635 640

Pro Gln Gln Asp Phe Thr Glu Ser Ile Tyr Leu Asp Tyr Arg His Phe
645 650 655

Asp Lys Ala Gly Ile Glu Pro Ile Tyr Glu Phe Gly Phe Gly Leu Ser
660 665 670

Tyr Thr Thr Phe Glu Tyr Ser Asp Leu Arg Val Val Lys Lys Tyr Val
675 680 685

Gln Pro Tyr Ser Pro Thr Thr Gly Thr Gly Ala Gln Ala Pro Ser Ile

690 695 700

Gly Gln Pro Pro Ser Gln Asn Leu Asp Thr Tyr Lys Phe Pro Ala Thr
705 710 715 720

Tyr Lys Tyr Ile Lys Thr Phe Ile Tyr Pro Tyr Leu Asn Ser Thr Val
725 730 735

Ser Leu Arg Ala Ala Ser Lys Asp Pro Glu Tyr Gly Arg Thr Asp Phe
740 745 750

Ile Pro Pro His Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Asn Pro Ala
755 760 765

Gly Asp Pro Val Ala Ser Gly Gly Asn Asn Met Leu Tyr Asp Glu Leu
770 775 780

Tyr Glu Val Thr Ala Gln Ile Lys Asn Thr Gly Asp Val Ala Gly Asp
785 790 795 800

Glu Val Val Gln Leu Tyr Val Asp Leu Gly Gly Asp Asn Pro Pro Arg
805 810 815

Gln Leu Arg Asn Phe Asp Arg Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Gln Ser Ser
820 825 830

Thr Phe Arg Ala Thr Leu Thr Arg Arg Asp Leu Ser Asn Trp Asp Ile
835 840 845

Glu Ala Gln Asn Trp Arg Val Thr Glu Ser Pro Lys Arg Val Tyr Val
850 855 860

Gly Arg Ser Ser Arg Asp Leu Pro Leu Ser Ser Gln Leu Glu
865 870 875

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Penicillium brasilianum

<220>

<221> misc_feature

<222> (23) .. (23)

<223> R = A or G

<220>
<221> misc_feature
<222> (26).. (26)
<223> N = A, C, G, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (29).. (29)
<223> Y = C or T

<400> 3
gcgctatcga gtctttctct garccnttyt a 31

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Penicillium brasilianum

<220>
<221> misc_feature
<222> (19) .. (19)
<223> N= A, C, G, or T

<220>
<221> misc feature
<222> (20) .. (20)
<223> K = G or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (22) .. (22)
<223> R = A o G

<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (25)
<223> N = A, C, G, o T

<400> 4
gtcggtcatg acgaagccnk graancc 27

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5
cttggtaccg agctcggatc cacta 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
atagggcgaa ttgggccctc tagat 25

<210> 7
<211> 40
<212> DNA
<213> Penicillium brasilianum

<400> 7
aatttgatca caccatgcag ggttctacaa tctttctgcc 40

<210> 8
<211> 34
<212> DNA
<213> Penicillium brasilianum

<400> 8
ttaactcgag ttactccaat tgtgagctca gcgg 34

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado con actividad de beta-glucosidasa y con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 95% de identidad con el polipéptido maduro mostrado como aminoácidos 37 a 878 de SEC ID n.º: 2.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2 o un fragmento de la misma con actividad de beta-glucosidasa.

3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, caracterizada por el hecho de que la secuencia codificante del polipéptido maduro son los nucleótidos 171 a 2753 de SEC ID n.º: 1.

4. Polipéptido según la reivindicación 1, que es codificado por el polinucleótido contenido en el plásmido pKKAB que está contenido en *E. coli* NRRL B-30860.

5. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Constructo de ácidos nucléicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

7. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucléicos según la reivindicación 6.

8. Una célula huésped recombinante transformada con y que comprende el constructo de ácidos nucléicos según la reivindicación 6.

9. Un método para la producción del polipéptido con actividad de beta-glucosidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de beta-glucosidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

10. Una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal, que ha sido transformada con y que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido con actividad de beta-glucosidasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

```
      M  Q  G  S  T  I  F  L  A  F  A  S  W  A  S  Q  V  A  A  I  A  Q  P  I  Q  K  H  E
TGAAAATGCAGGGTTCTACAATCTTTCTGGCTTTCGCCTCATGGGCGAGCCAGGTTGCTGCCATTGCGCAGCCCATACAGAAGCACGAGGTTTGTTTTAT
                                                                  P  G  F  L  H  G  P  Q  A  I  E  S  F  S  E  P  F  Y
CTTGCTCATGGACGTGCTTTGACTTGACTAATTGTTTTACATACAGCCCGGATTTCTGCACGGGCCCCAAGCCATAGAATCGTTCTCAGAACCGTTCTAC
 P  S  P  W  M  N  P  H  A  E  G  W  E  A  A  Y  Q  K  A  Q  D  F  V  S  Q  L  T  I  L  E  K  I  N
CCGTCGCCCTGGATGAATCCTCACGCCGAGGGCTGGGAGGCCGCATATCAGAAAGCTCAAGATTTTGTCTCGCAACTCACTATCTTGGAGAAAATAAATC
L  T  T  G  V  G                                                                W  E  N  G  P  C  V  G  N
TGACCACCGGTGTTGGGTAAGTCTCTCCGACTGCTTCTGGGTCACGGTGCGACGAGCCACTGACTTTTTGAAGCTGGGAAAATGGGCCGTGTGTAGGAAA
 T  G  S  I  P  R  L  G  F  K  G  F  C  T  Q  D  S  P  Q  G  V  R  F  A  D  Y  S  S  A  F  T  S  S
CACTGGATCAATTCCTCGTCTCGGATTCAAAGGATTTTGTACCCAGGATTCACCACAGGGTGTTCGGTTCGCAGATTATTCCTCCGCTTTCACATCTAGC
 Q  M  A  A  A  T  F  D  R  S  I  L  Y  Q  R  G  Q  A  M  A  Q  E  H  K  A  K  G  I  T  I  Q  L  G
CAAATGGCCGCCGCAACATTTGACCGCTCAATTCTTTATCAACGAGGCCAAGCCATGGCACAGGAACACAAGGCTAAGGGTATCACAATTCAATTGGGCC
P  V  A  G  P  L  G  R  I  P  E  G  G  R  N  W  E  G  F  S  P  D  P  V  L  T  G  I  A  M  A  E  T  I
CTGTTGCCGGCCCTCTCGGTCGCATCCCCGAGGGCGGCCGCAACTGGGAAGGATTCTCCCCTGATCCTGTCTTGACTGGTATAGCCATGGCTGAGACAAT
 K  G  M  Q  D  T  G  V  I  A  C  A  K  H  Y  I  G  N  E  Q  E  H  F  R  Q  V  G  E  A  A  G  H  G
TAAGGGCATGCAGGATACTGGAGTGATTGCTTGCGCTAAACATTATATTGGAAACGAGCAGGAGCACTTCCGTCAAGTGGGTGAAGCTGCGGGTCACGGA
 Y  T  I  S  D  T  I  S  S  N  I  D  D  R  A  M  H  E  L  Y  L  W  P  F  A  D  A  V  R  A  G  V  G
TACACTATTTCCGATACTATTTCATCTAATATTGACGACCGTGCTATGCATGAGCTATACTTGTGGCCATTTGCTGATGCCGTTCGCGCTGGTGTGGGTT
S  F  M  C  S  Y  S  Q  I  N  N  S  Y  G  C  Q  N  S  Q  T  L  N  K  L  L  K  S  E  L  G  F  Q  G  F
CTTTCATGTGCTCATACTCTCAGATCAACAACTCCTACGGATGCCAAAACAGTCAGACCCTCAACAAGCTCCTCAAGAGCGAATTGGGCTTCCAAGGCTT
 V  M  S  D  W  G  A  H  H  S  G  V  S  S  A  L  A  G  L  D  M  S  M  P  G  D  T  E  F  D  S  G  L
TGTCATGAGCGATTGGGGTGCCCATCACTCTGGAGTGTCATCGGCGCTAGCTGGACTTGATATGAGCATGCCGGGTGATACCGAATTTGATTCTGGCTTG
 S  F  W  G  S  N  L  T  I  A  I  L  N  G  T  V  P  E  W  R  L  D  D  M  A  M  R  I  M  A  A  Y  F
AGCTTCTGGGGCTCTAACCTCACCATTGCAATTCTGAACGGCACGGTTCCCGAATGGCGCCTGGATGACATGGCGATGCGAATTATGGCTGCATACTTCA
K  V  G  L  T  I  E  D  Q  P  D  V  N  F  N  A  W  T  H  D  T  Y  G  Y  K  Y  A  Y  S  K  E  D  Y  E
AAGTTGGCCTTACTATTGAGGATCAACCAGATGTCAACTTCAATGCCTGGACCCATGACACCTACGGATATAAATACGCTTATAGCAAGGAAGATTACGA
 Q  V  N  W  H  V  D  V  R  S  D  H  N  K  L  I  R  E  T  A  A  K  G  T  V  L  L  K  N  N  F  H  A
GCAGGTCAACTGGCATGTCGATGTTCGCAGCGACCACAATAAGCTCATTCGCGAGACTGCCGCGAAGGGTACAGTTCTGCTGAAGAACAACTTTCATGCT
 L  P  L  K  Q  P  R  F  V  A  V  V  G  Q  D  A  G  P  N  P  K  G  P  N  G  C  A  D  R  G  C  D  Q
```

Fig. 1A

CTCCCTCTGAAGCAGCCCAGGTTCGTGGCCGTCGTTGGTCAGGATGCCGGGCCAAACCCCAAGGGCCCTAACGGCTGCGCAGACCGAGGATGCGACCAAG
G T L A M G W G S G S T E F P Y L V T P D T A I Q S K V L E Y G G R
GCACTCTCGCAATGGGATGGGGCTCAGGGTCTACCGAATTCCCTTACCTGGTCACTCCTGACACTGCTATTCAGTCAAAGGTCCTCGAATACGGGGGTCG
Y E S I F D N Y D D N A I L S L V S Q P D A T C I V F A N A D S G
ATACGAGAGTATTTTTGATAACTATGACGACAATGCTATCTTGTCGCTTGTCTCACAGCCTGATGCAACCTGTATCGTTTTTGCAAATGCCGATTCCGGT
E G Y I T V D N N W G D R N N L T L W Q N A D Q V I S T V S S R C
GAAGGCTACATCACTGTCGACAACAACTGGGGTGACCGCAACAATCTGACCCTCTGGCAAAATGCCGATCAAGTGATTAGCACTGTCAGCTCGCGATGCA
N N T I V V L H S V G P V L L N G I Y E H P N I T A I V W A G M P G
ACAACACAATCGTTGTTCTCCACTCTGTCGGACCAGTGTTGCTAAATGGTATATATGAGCACCCGAACATCACAGCTATTGTCTGGGCAGGGATGCCAGG
E E S G N A L V D I L W G N V N P A G R T P F T W A K S R E D Y G
CGAAGAATCTGGCAATGCTCTCGTGGATATTCTTTGGGGCAATGTTAACCCTGCCGGTCGCACTCCGTTCACCTGGGCCAAAAGTCGAGAGGACTATGGC
T D I M Y E P N N G Q R A P Q Q D F T E S I Y L D Y R H F D K A G
ACTGATATAATGTACGAGCCCAACAACGGCCAGCGTGCGCCTCAGCAGGATTTCACCGAGAGCATCTACCTCGACTACCGCCATTTCGACAAAGCTGGTA
I E P I Y E F G F G L S Y T T F E Y S D L R V V K K Y V Q P Y S P T
TCGAGCCAATTTACGAGTTTGGATTCGGCCTCTCCTATACCACCTTCGAATACTCTGACCTCCGTGTTGTGAAGAAGTATGTTCAACCATACAGTCCCAC
T G T G A Q A P S I G Q P P S Q N L D T Y K F P A T Y K Y I K T F
GACCGGCACCGGTGCTCAAGCACCTTCCATCGGACAGCCACCTAGCCAGAACCTGGATACCTACAAGTTCCCTGCTACATACAAGTACATCAAAACCTTC
I Y P Y L N S T V S L R A A S K D P E Y G R T D F I P P H A R D G
ATTTATCCCTACCTGAACAGCACTGTCTCCCTCCGCGCTGCTTCCAAGGATCCCGAATACGGTCGTACAGACTTTATCCCACCCCACGCGCGTGATGGCT
S P Q P L N P A G D P V A S G G N N M L Y D E L Y E V T A Q I K N T
CCCCTCAACCTCTCAACCCCGCTGGAGACCCAGTGGCCAGTGGTGGAAACAACATGCTCTACGACGAACTTTACGAGGTCACTGCACAGATCAAAAACAC
G D V A G D E V V Q L Y V D L G G D N P P R Q L R N F D R F Y L L
TGGCGACGTGGCCGGCGACGAAGTCGTCCAGCTTTACGTAGATCTCGGGGGTGACAACCCGCCTCGTCAGTTGAGAAACTTTGACAGGTTTTATCTGCTG
P G Q S S T F R A T L T R R D L S N W D I E A Q N W R V T E S P K
CCCGGTCAGAGCTCAACATTCCGGGCTACATTGACGCGCCGTGATTTGAGCAACTGGGATATTGAGGCGCAGAACTGGCGAGTTACGGAATCGCCTAAGA
R V Y V G R S S R D L P L S S Q L E *
GAGTGTATGTTGGACGGTCGAGTCGGGATTTGCCGCTGAGCTCACAATTGGAGTAATGATCATGTCTACCAATAGATGTTGAATGTCTGGTGTGGATATT

Fig. 1B

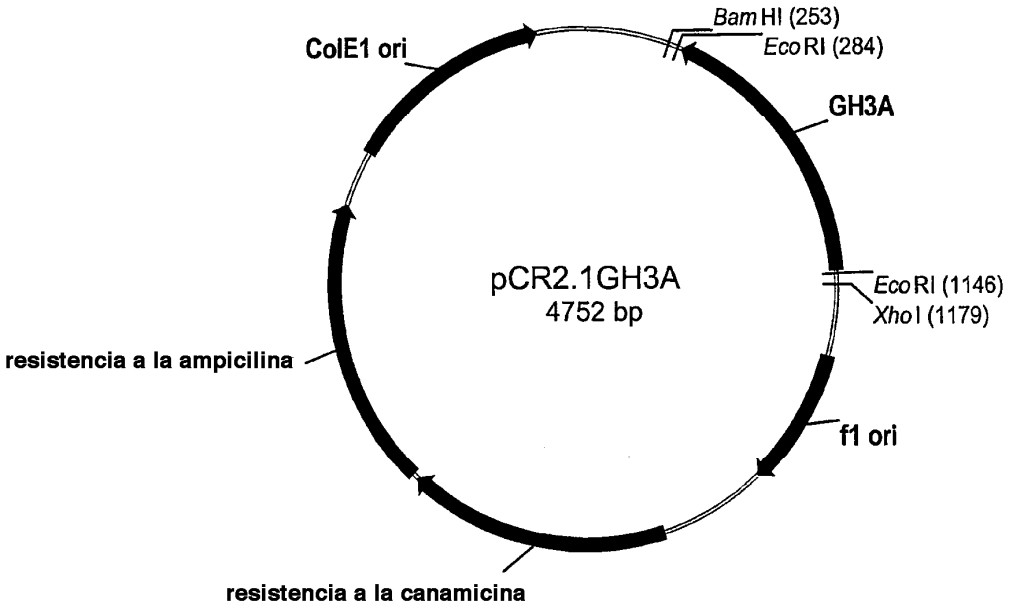
BamHI (253)
EcoRI (284)
ColE1 ori
GH3A
pCR2.1GH3A
4752 bp
EcoRI (1146)
XhoI (1179)
resistencia a la ampicilina
f1 ori
resistencia a la canamicina

Fig. 2

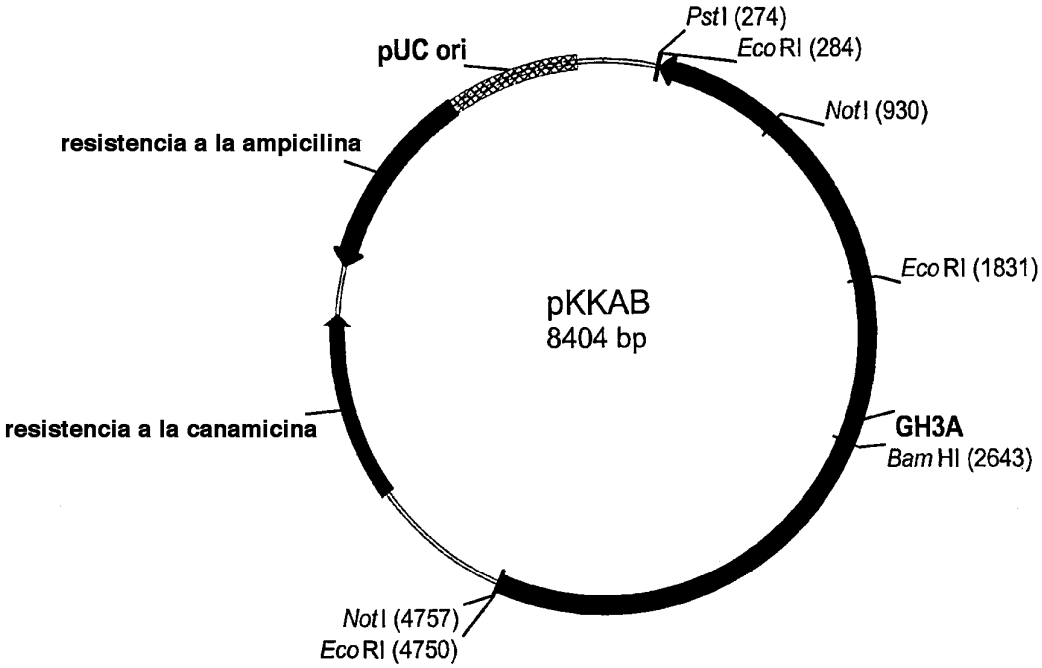
PstI (274)
EcoRI (284)
pUC ori
NotI (930)
resistencia a la ampicilina
EcoRI (1831)
pKKAB
8404 bp
resistencia a la canamicina
GH3A
BamHI (2643)
NotI (4757)
EcoRI (4750)

Fig. 3

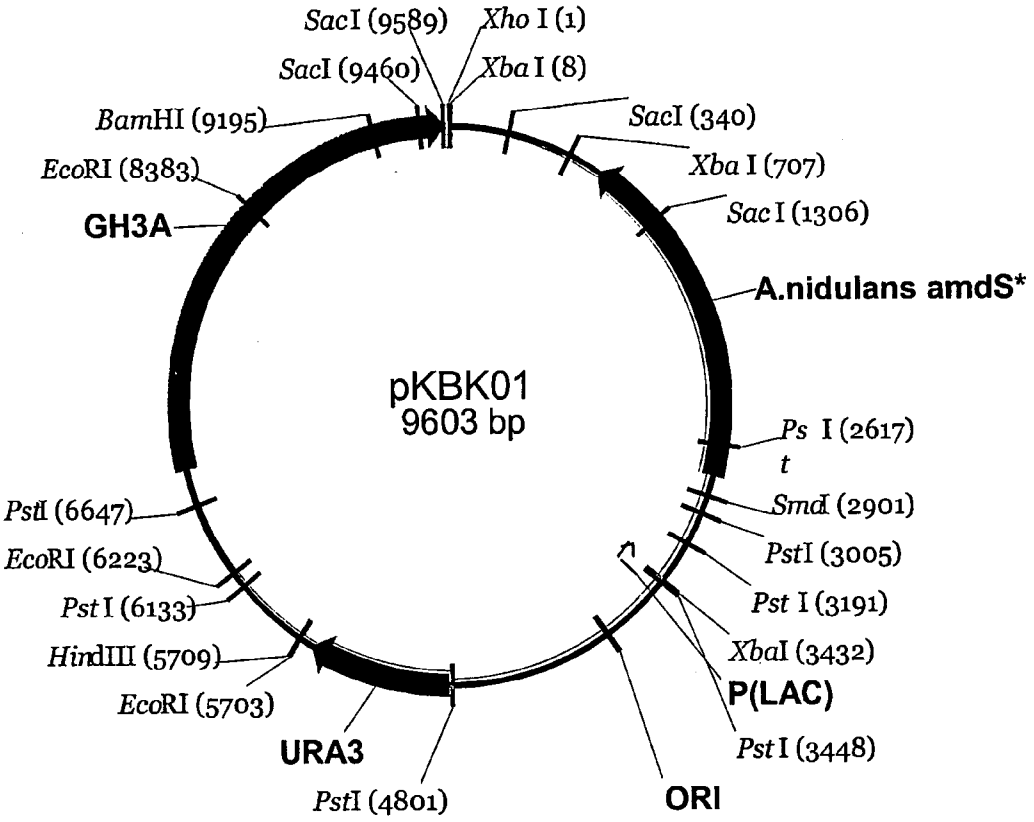
SacI (9589)
Xho I (1)
SacI (9460)
Xba I (8)
BamHI (9195)
SacI (340)
EcoRI (8383)
Xba I (707)
GH3A
Sac I (1306)
A.nidulans amdS*
pKBK01
9603 bp
Ps I (2617)
t
PstI (6647)
SmaI (2901)
EcoRI (6223)
PstI (3005)
Pst I (6133)
Pst I (3191)
HindIII (5709)
XbaI (3432)
EcoRI (5703)
P(LAC)
URA3
Pst I (3448)
PstI (4801)
ORI

Fig. 4

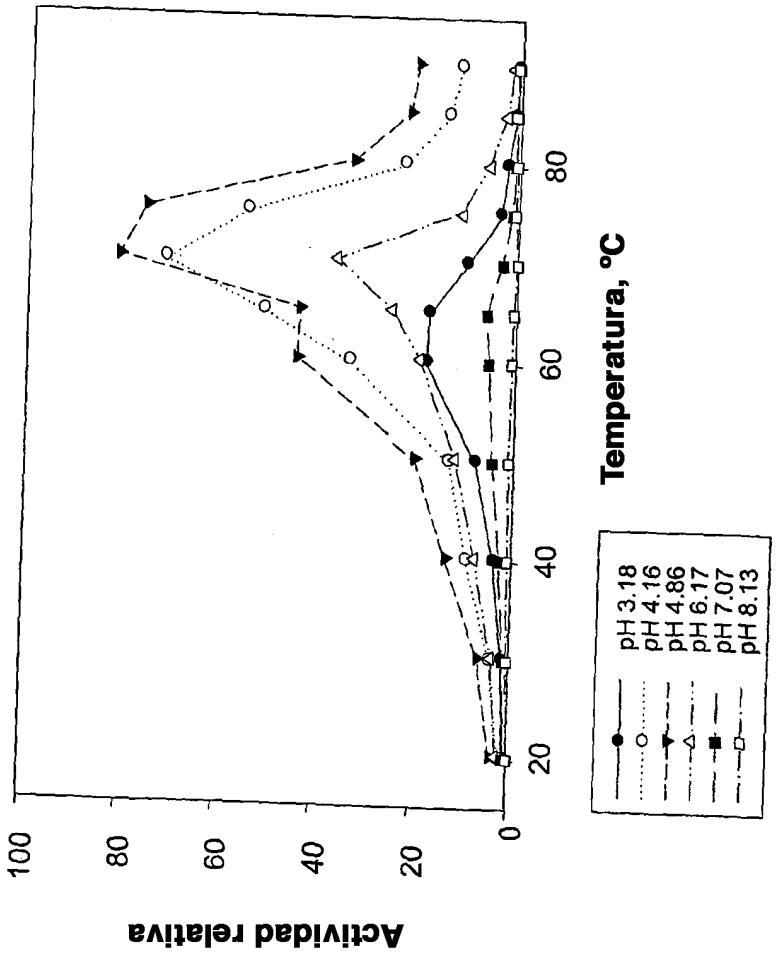
Actividad relativa
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
Temperatura, °C
pH 3.18
pH 4.16
pH 4.86
pH 6.17
pH 7.07
pH 8.13

Fig. 5

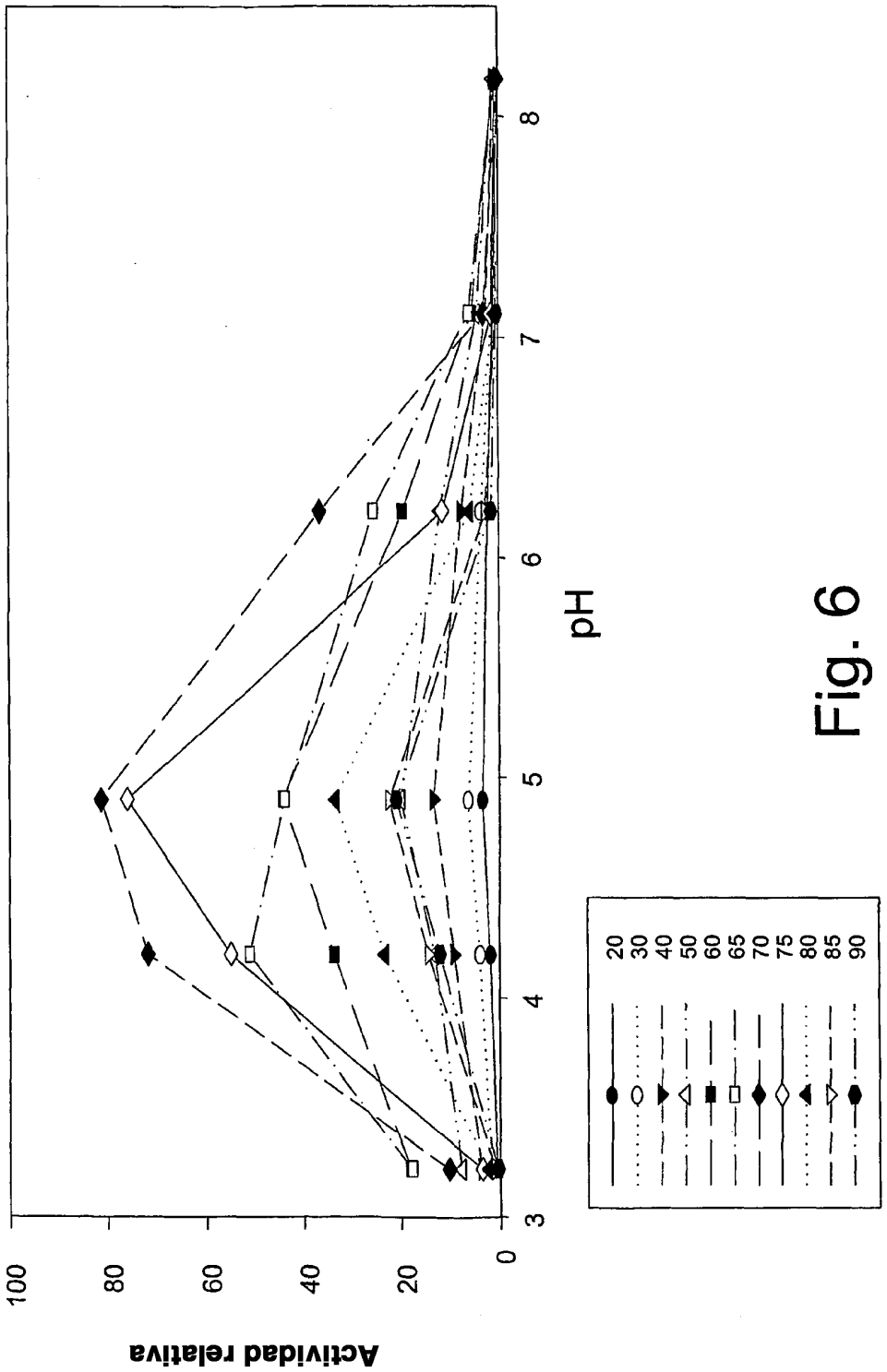
Actividad relativa
100
80
60
40
20
0
3
4
5
6
7
8
pH
20
30
40
50
60
65
70
75
80
85
90

Fig. 6

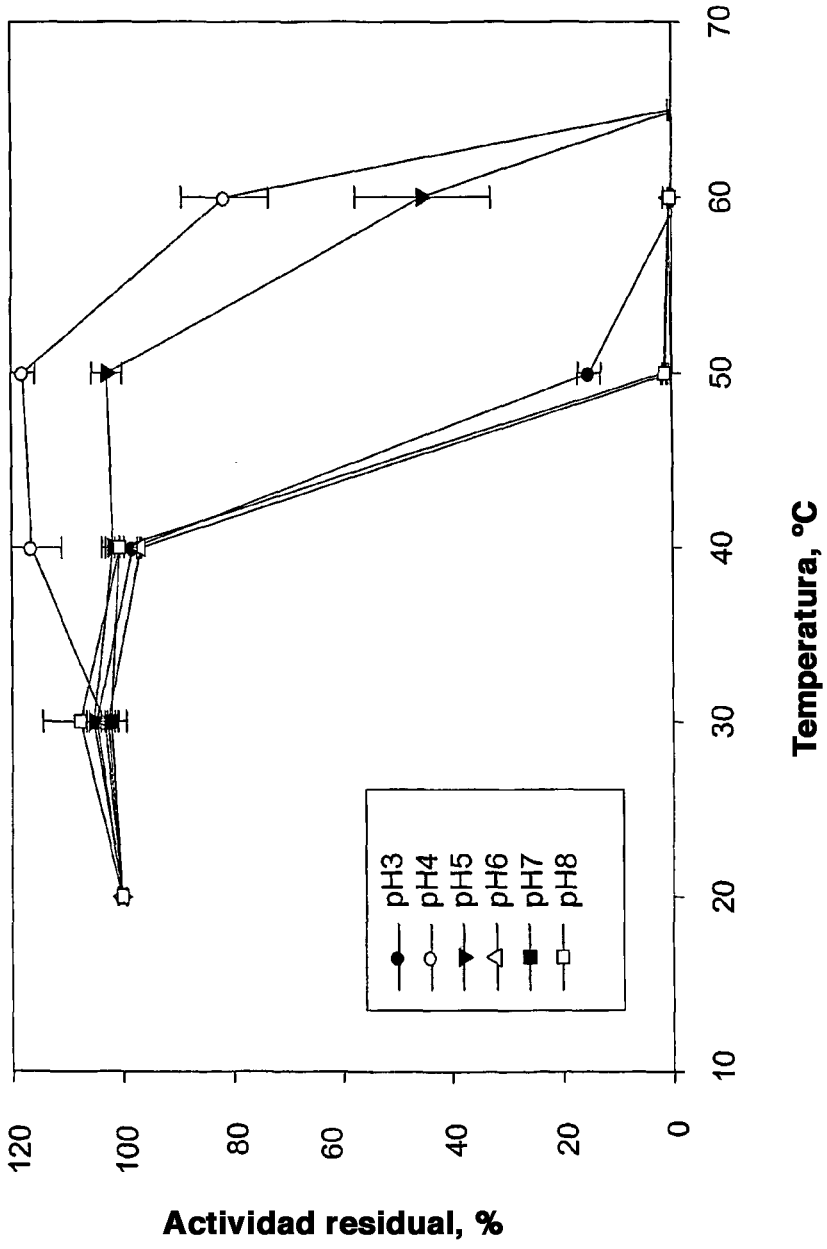
Actividad residual, %
120
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
70
Temperatura, °C
pH3
pH4
pH5
pH6
pH7
pH8

Fig. 7

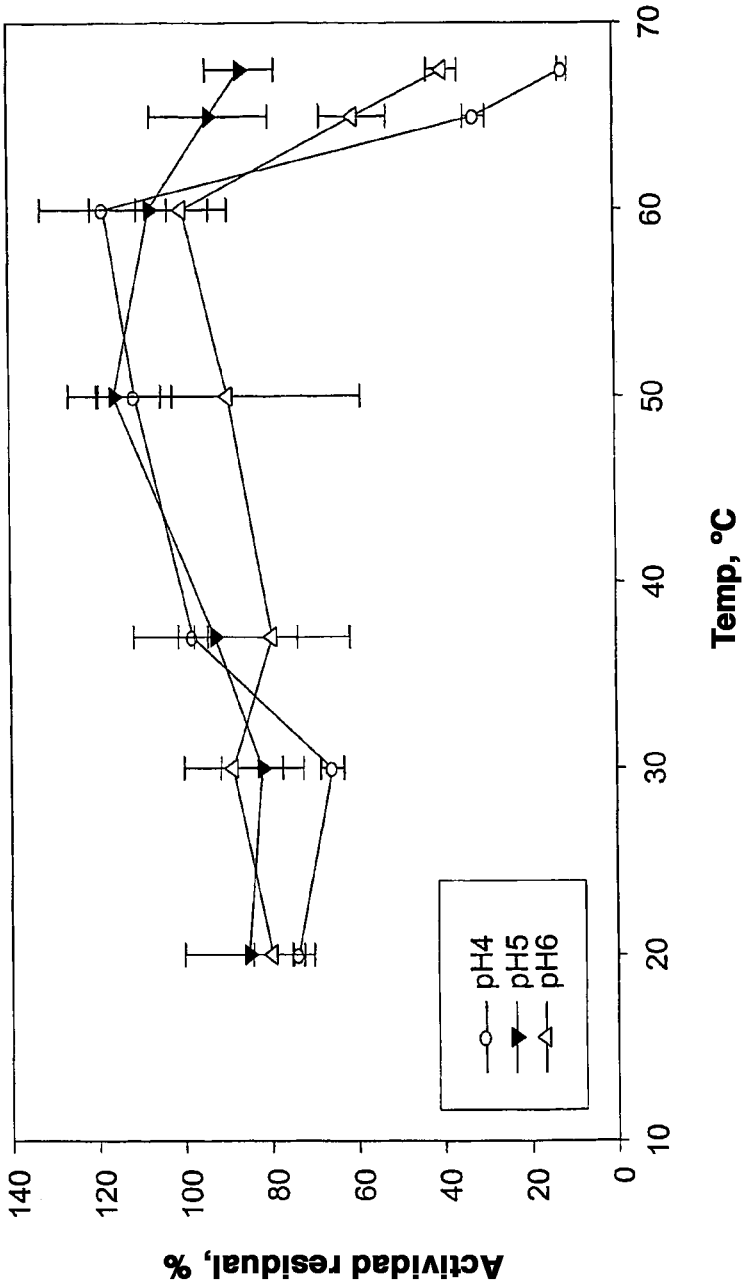
Actividad residual, %
140
120
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
60
70
Temp, °C
pH4
pH5
pH6

Fig. 8

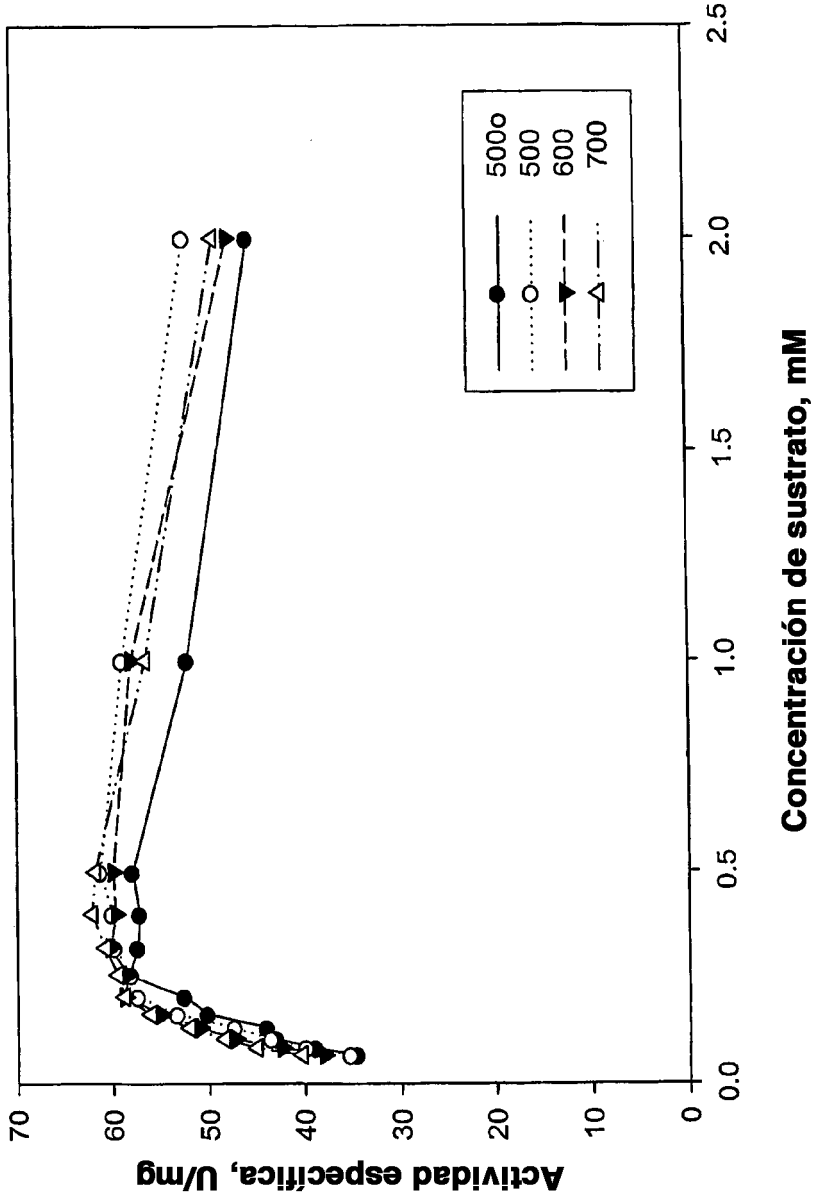
Actividad específica, U/mg
70
60
50
40
30
20
10
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Concentración de sustrato, mM
500o
500
600
700

Fig. 9

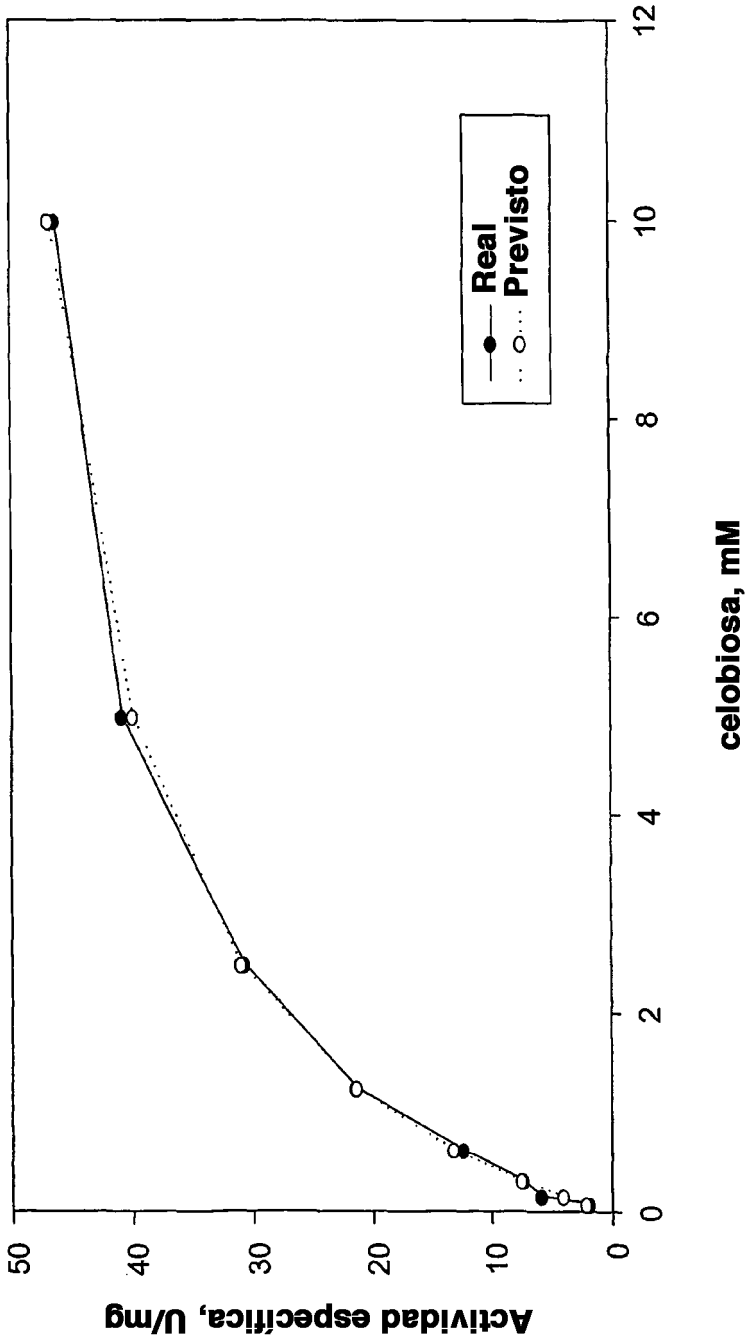
Actividad específica, U/mg
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
celobiosa, mM
Real
Previsto

Fig. 10